

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik – Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München
Ehemalige Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum
Jetzt: Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankheiten
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber

**Funktionale Charakterisierung von Frizzled-Rezeptoren
in mesodermalen Tumor-Zellen
Einfluss von Frizzled 8 auf Proliferation und Invasion**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ulrike Leitenstern

aus
München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Peter Neth
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. David Horst
	PD Dr. Dominik Modest
	Prof. Dr. Irmela Jeremias
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	22.11.2018

Meinen lieben Eltern und Geschwistern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
A Zusammenfassung.....	1
B Einleitung.....	3
B.1 Sarkome als Modell für Tumore mesenchymalen Ursprungs	3
B.1.1 Osteosarkom.....	3
B.1.2 Fibrosarkom	3
B.2 Die Wnt Signalwege - Funktion und Bedeutung.....	4
B.3 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg und seine Komponenten	9
B.3.1 Frizzled-Rezeptoren (Fzd)	10
B.3.2 LRP5 und LRP6	11
B.3.3 Signalweiterleitung über LRP und Fzds.....	13
B.3.4 Frizzled und Dishevelled (Dvl).....	13
B.4 Aktivierung spezifischer Wnt-Target-Gene	14
B.4.1 TCF/LEF	14
B.4.2 Regulation der TCF/LEF-Proteine.....	14
B.5 Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf die Tumorentstehung	15
B.5.1 Intrazelluläre Mechanismen	15
B.5.2 Extrazelluläre Mechanismen	16
B.6 Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-4 (IGFBP-4)	16
B.6.1 Funktion und Bedeutung	16
B.6.2 IGFBP-4 als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin Signalweges.....	18
C Fragestellung und Zielsetzung.....	19

D	Material und Methoden	20
D.1	Geräte und Material	20
D.1.1	Geräte	20
D.1.2	Bioinformatische Hilfsmittel	22
D.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	23
D.1.4	Vektoren	24
D.1.5	Primer für die quantitative RT-PCR.....	25
D.1.6	Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken.....	27
D.1.6.1	Chemikalien und Materialien	27
D.1.6.2	Bakterienstämme	27
D.1.7	Chemikalien und Materialien für zellbiologische Techniken.....	27
D.1.7.1	Chemikalien und Materialien	27
D.1.7.2	siRNAs	29
D.1.7.3	Zelllinien.....	30
D.1.8	Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken	30
D.1.8.1	Chemikalien und Materialien	30
D.1.8.2	Rekombinante Proteine.....	31
D.2	Methoden	32
D.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
D.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
D.2.1.2	Analytische Agarosegel-Elektrophorese.....	33
D.2.1.3	DNA-Sequenzierung.....	34
D.2.1.4	Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen	34
D.2.1.5	cDNA-Synthese	36
D.2.1.6	Quantitative RT-PCR	37
D.2.2	Mikrobiologische Methoden	40
D.2.2.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Stämme.....	40
D.2.2.2	Kultivierung und Selektion transformierter <i>E. coli</i> -Stämme	40
D.2.2.3	Herstellung und Lagerung der <i>E. coli</i> -Stämme	41
D.2.3	Zellbiologische Methoden	41
D.2.3.1	Zellen Auftauen und Einfrieren	41
D.2.3.2	Kultivierung von SAOS-2 bzw. HT1080	42

D.2.3.3	Splitten konfluenter Zellen	42
D.2.3.4	Zellzahlbestimmung	43
D.2.3.5	Transfektion	43
D.2.3.6	Picken einzelner Zell-Klone mit Klonierungszyklindern	46
D.2.3.7	Zellinvasionsstudien.....	47
D.2.3.8	Proliferationsstudien	49
D.2.3.9	Gaussia-Luciferase-Aktivitätsmuster in stabil transfizierten HT1080-Zellen	50
D.2.4	Datenanalyse	52
E	Ergebnisse	53
E.1	Basales Fzd-Expressionsmuster	53
E.1.1	Basales Fzd-Expressionsmuster in SAOS-2 Zellen.....	53
E.1.2	Basales Fzd-Expressionsmuster in HT1080 Zellen	54
E.2	Stabile Transfektion von SAOS-2 Zellen mit pEGFP-N3	55
E.3	Analyse des Invasionsverhaltens	55
E.3.1	Etablierung des Transwell-Assay für SAOS-2-EGFP	55
E.3.2	Analyse des Invasionsverhaltens von HT1080-EGFP Zellen	57
E.4	Nachweis von Wnt/ β -Catenin abhängiger Signaltransduktion mittels TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen	58
E.4.1	Generierung funktionsfähiger TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen	58
E.4.2	Reportergenaktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen nach Knockdown einzelner Fzd-Rezeptoren	59
E.4.3	Rezeptorgenaktivität in TCF/LEF-Reporter HT1080 nach Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 bzw. Fzd3 und 5.....	62
E.5	Untersuchung der Fzd8-Funktion in HT1080 Zellen	63
E.5.1	Knockdown von Fzd8 in HT1080 Zellen	63
E.5.2	Invasionsverhalten von HT1080 Zellen nach Fzd8-Knockdown	64
E.5.3	Proliferationsverhalten von HT1080 Zellen nach Knockdown von Fzd8.....	64
E.5.4	Regulation der Fzd8-Expression durch Wnt3a in HT1080 Zellen	65
E.6	Einfluss von IGFBP-4 auf den Wnt-/ β -Catenin Signalweg in HT1080	66
E.6.1	Cyclin D1-Expression in HT1080 Zellen nach Stimulation mit IGFBP-4	66

E.6.2	IGFBP-4-abhängige Auswirkungen auf die Reporteraktivität in TCF/LEF-Reporter HT1080 Zellen.....	68
F	Diskussion	71
F.1	Basales Fzd-Expressionsmuster	71
F.1.1	Basales Fzd-Expressionsmuster in SAOS-2 Zellen.....	71
F.1.2	Basales Fzd-Expressionsmuster in HT1080 Zellen	71
F.2	Stabile Transfektion von mesenchymalen Tumorzellen (SAOS-2/HT1080) mit pEGFP-N3	73
F.3	Analyse des Invasionsverhaltens	74
F.3.1	Etablierung des Transwell-Assays für SAOS-2-EGFP	74
F.3.2	Analyse des Invasionsverhaltens von HT1080-EGFP Zellen	76
F.4	Nachweis von Wnt/ β -Catenin abhängiger Signaltransduktion mittels TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen	77
F.4.1	Generierung funktionsfähiger TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen	77
F.4.2	Reporterogenaktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen nach Knockdown einzelner Fzd-Rezeptoren	78
F.4.3	Rezeptorgenaktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 nach Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 bzw. Fzd3 und 5.....	79
F.5	Untersuchung der Fzd8-Funktion in HT1080 Zellen	80
F.5.1	Invasions- und Proliferationsverhalten von HT1080 Zellen nach Fzd8-Knockdown	80
F.5.2	Regulation der Fzd8-Expression durch Wnt3a in HT1080 Zellen	81
F.6	Einfluss von IGFBP-4 auf den Wnt-/ β -Catenin Signalweg in HT1080 Zellen	82
F.6.1	Cyclin D1-Expression in HT1080 Zellen nach Stimulation mit IGFBP-4	83
F.6.2	IGFBP-4-abhängige Auswirkungen auf die Reporteraktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen	84
G	Ausblick	86
H	Literaturnachweis.....	87
I	Danksagung.....	102
J	Eidesstattliche Versicherung.....	103

Abbildungsverzeichnis

Abb. B-1:	Differenzierungsformen mesenchymaler Stammzellen.....	4
Abb. B-2:	Übersicht über die drei verschiedenen Wnt-Signalwege.....	8
Abb. B-3:	Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges	9
Abb. D-1:	Vektorkarte des Reporterplasmids pEGFP-N3	24
Abb. D-2:	Vektorkarte des Reporterplasmids pN3-BAR-GLuc.....	25
Abb. E-1:	Vergleich der basalen Expression von Frizzled 1-8 in SAOS-2 Zellen auf mRNA-Ebene.....	53
Abb. E-2:	Vergleich der basalen Expression von Frizzled 1-8 in HT1080 Zellen auf mRNA-Ebene.....	54
Abb. E-3:	Verschiedene SAOS-2 Zell-Klone nach stabiler Transfektion mit EGFP-N3.....	55
Abb. E-4:	Invasionsraten von HT1080 Zellen bei verschiedenen Humanserum-Konzentrationen über 12 und 24 Stunden.	57
Abb. E-5:	Gaussia-Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 nach LiCl-Stimulation in Kultivierungsmedium mit 10 % FBS.	58
Abb. E-6:	Gaussia-Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 nach LiCl-Stimulation. Die FBS-Konzentration im Kultivierungsmedium betrug 2 %.	59
Abb. E-7:	Gaussia-Luciferase-Aktivität nach RNAi-Knockdown von Fzd1, 2, 3, 4, 5 und 7.....	61
Abb. E-8:	Gaussia-Luciferase-Aktivität nach RNAi-Knockdown von Fzd6.....	62
Abb. E-9:	Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 bzw. Fzd3 und 5.....	62
Abb. E-10:	siRNA-vermittelte Knock-Down-Effizienzen von Fzd8 in HT1080.	63
Abb. E-11:	Invasionsverhalten von HT1080-Zellen nach Knockdown von Fzd8	64
Abb. E-12:	Proliferationsverhalten von HT1080 Zellen nach Knockdown von Fzd8.....	65
Abb. E-13:	Fzd8-mRNA-Expression nach Stimulation mit Wnt3a.....	66
Abb. E-14:	Basales mRNA-Expressionsprofil der Wnt-Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6 in HT1080, SAOS-2 und hMSC.	67

Abb. E-15:	Cyclin D1-mRNA-Expression in HT1080 Zellen nach Stimulation mit IGFBP-4	68
Abb. E-16:	Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit IGFBP-4 in TCF/ LEF-Reporter-HT1080	69
Abb. E-17:	Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IGFBP-4 in einem Zeitraum von 9 Tagen.	70

Tabellenverzeichnis

Tab. D-1:	Primer für die TaqMan qRT-PCR.....	26
Tab. D-2:	siRNAs zur Transfektion von SAOS-2 und HT1080	29
Tab. D-3:	Master-Mix für cDNA-Synthese.....	36
Tab. D-4:	Pipettierschema UPL.....	38
Tab. D-5:	Pipettierschema für den SYBR-Green-Ansatz.....	39
Tab. D-6:	Einfriermedien für SAOS-2 und HT1080 Zelllinien	42
Tab. D-7:	Kultivierungsmedien für die SAOS-2 und HT1080 Zelllinien	42
Tab. D-8:	Verdünnungsreihen für den Zellstandard im CyQuant-Assay.....	50
Tab. D-9:	Übersicht über die Zellzahlen und Füllvolumina in Versuchen mit pN3- BAR-Gluc	52
Tab. E-1:	Zusammensetzung der Transwell-Assays zur Untersuchung des Invasionsvermögens von SAOS-2-EGFP.....	56
Tab. E-2:	Knockdown-Effizienzen in HT1080 nach siRNA-Knockdown von Fzd1-7	60

Abkürzungsverzeichnis

Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges

APC	Adenomatosis Polyposis Coli
Arm	Armadillo
Arr	Arrow
Calm	Calmodulin
Cam	Calmodulin-Kinase
CK-1 (α oder γ)	Caseinkinase-1 (α oder γ)
CRD	context-dependent regulatory domain
CRD	cystein rich domain
DEP	Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin (domain)
Dkk	Dickkopf
Dvl	Dishevelled
DIX	Dishevelled homologous domain
GPCR	G-protein coupled receptor
Gro	Groucho
EphB3	Ephrin type-B receptor 3
Fzd (DFzd, hFzd, mFzd, rFzd)	Frizzled-Rezeptor (in Drosophila, Mensch, Maus, Ratte)
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
HMG	high mobility group
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IGFBP	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein
Int-1	mouse mammary tumor virus integration site 1
JNK	c-jun NH ₂ -terminale kinase
LDL	low-density-lipoprotein
LEF	lymphoid enhancer-binding protein
LOH	loss of heterozygosity
LRP	low-density-lipoprotein receptor-related protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMTV	mouse mammary tumor virus

NLK	Nemo-like kinase
NLS	nuclear localisation signal
PCP	planar cell polarity
PDZ	postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occludens-1
PKC	Proteinkinase C
RANKL	Receptor Activator of NFκB Ligand
RGS	Regulator of G protein Signalling
RhoK	Rho-Kinase
RuNX ₂	Runt-related transcription factor 2
sFRP	secreted frizzled-related protein
Smo/SMOH	Smoothed
TAK	transforming growth factor activated kinase
TCF	T-cell-specific transcription factor
TLE	transducin-like enhancer of split
WIF-1	Wnt inhibitory factor 1
Wnt (hWnt, XWnt)	Akronym aus „Wingless“ und „Int-1“ (human, Xenopus)

Methoden und Substanzen in Molekular- und Zellbiologie

αMEM	minimal essential medium alpha
Amp	Ampicillin
BAR	β-catenin activated reporter
BCA	bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
CMV	Zytomegalievirus
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA (cDNA, dsDNA, gDNA)	Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA, Doppelseitige DNA, genomische DNA)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
FBS	fetal bovine serum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GLuc	Gaussia Luciferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
hECM	humane extrazelluläre Matrix
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Kan	Kanamycin
MCS	Multiple cloning site
Neo	Neomycin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pTKmin	Thymidin-Kinase Promotor
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
Ras	Rat sarcoma
RE	Restriktionsenzym
RNA (mRNA)	Ribonukleinsäure (messenger-RNA)
RNAi	RNA interference
RT	Reverse Transkriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris buffered saline with Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
tTS	tetracycline-controlled-transcriptional suppressor
UPL	universal probe library

Zelltypen

1549	Xenocraft Modell d. Kleinzelligen Lungenkarzinoms
CRL2335TNBC	Triple Negative-Breast-Cancer
E. coli	Escherichia coli
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
HEK293	human embryonic kidney cells
HT1080	Humane Fibrosarkomzellen
iPS cells	induced pluripotent stem cells
MG-63	Humane Osteosarkomzellen
MRC-5	human embryonic fibroblasts
P19CL6	Kardiomyozyten Progenitor-Zellen
SAOS-2	Humane Osteosarkomzellen

Einheiten/sonstige Abkürzungen

kb	Kilobasen
nc	negative control
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
RLU	Relative light units
RT	Raumtemperatur

A Zusammenfassung

Dem kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg kommt grundlegende Bedeutung während der embryonalen Entwicklung zu. Dort spielt er eine wichtige Rolle für die Differenzierung, Proliferation, Migration, Polarität und den Tod der Zellen (Miller 2002). Im Erwachsenenalter kann eine fehlgesteuerte Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweges Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum verschiedener Tumore haben (Polakis 2000; Miller 2002; van Es, Barker et al. 2003; Gregorieff and Clevers 2005) oder die Homöostase der Körperfunktionen beeinträchtigen (Patel and Karsenty 2002; Levasseur, Lacombe et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollte der regulierende Einfluss der Oberflächenrezeptoren des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweges, der sog. Frizzled-Rezeptoren (Fzds), auf Tumorzellen mesenchymalen Ursprungs (SAOS-2 Zellen, HT1080 Zellen) untersucht werden. Zusätzlich bestand ein Bestandteil der Analysen in der Untersuchung des Einflusses eines Regulator-Proteins IGFBP-4, welches in cardiomyozytischen Vorläuferzellen das kanonische Wnt-Signal inhibiert (Zhu, Shiojima et al. 2008).

Die initialen Untersuchungen zeigten, dass die Frizzled-Rezeptoren 1-8 sowohl in SAOS-2 als auch in HT1080 exprimiert wurden. Auffälligerweise zeigte sich die Expression von Fzd8 in HT1080 als besonders hoch.

Aufgrund der ausgesprochen hohen Expression von Fzd8 und ihres hohen Invasionspotentials wurden die weiteren Untersuchungen ausschließlich an HT1080 durchgeführt. Für die Durchführung des Transwell-Assay mit HT1080 konnten optimierte Bedingungen etabliert werden.

Mit Hilfe von TCF/LEF-Reporter-HT1080 konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit des jeweiligen Fzd-Rezeptor-Knockdowns divergente Auswirkungen bzgl. des Wnt/ β -Catenin-Signalweges vorlagen. So zeigte sich bei RNA gegen Fzd1, 2, 3, 4, 5 und 7 eine erniedrigte Reporteraktivität, wo hingegen bei einem Knockdown von Fzd6 zunächst eine Zunahme der Gaussia-Luciferase-Aktivität zu beobachten war. Der Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 als auch der von Fzd3 und 5 war mit einer nachhaltigen Abnahme der Gaussia-Luciferase-Sekretion assoziiert.

Aufgrund seiner ausgeprägten Expression wurde mittels siRNA ein Knockdown von Fzd8 in HT1080 durchgeführt. Hierbei kam es zu einer Abnahme von Invasions- und Proliferationsfähigkeit von HT1080 Zellen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation von HT1080 mit Wnt3a zu einer verminderten Expression von Fzd8 kam, was auf eine negative Abhängigkeit der Fzd8-Expression vom Wnt3a-Signal hinweist.

Zusätzlich konnte über die Synthese von Cyclin D1, welches ein etabliertes Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges darstellt, gezeigt werden, dass auch in HT1080, genauso wie in Kardiomyozyten Progenitor-Zellen, IGFBP-4 als Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalweges fungiert.

Weitere Stimulationsversuche mit IGFBP-4 in Tcf/Lef-Reporter-HT1080 Zellen zeigten ebenfalls einen Rückgang der Gaussia-Luciferase-Sekretion und damit einen erhöhten Abbau von β -Catenin. Hierbei konnte durch die wiederkehrende Applikation von IGFBP-4 eine anhaltende Verminderung der β -Catenin-abhängigen Luciferase-Sekretion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Fzd1-8 in SAOS-2 und HT1080 exprimiert werden, wobei die Zelllinie HT1080 aufgrund ihrer guten Invasions-Eigenschaften und hohen Expression von Fzd8, als Zellmodel weiterer Untersuchungen gewählt wurde. In Abhängigkeit des jeweiligen Fzd-Rezeptor-Knockdowns lagen divergente Auswirkungen bzgl. des Wnt/ β -Catenin-Signalweges vor. Insbesondere durch Knockdown von Fzd8 konnte eine reduzierte Invasivität und Proliferation in HT1080 nachgewiesen werden. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine negative Abhängigkeit der Fzd8-Expression vom Wnt3a-Signal. Zusätzlich konnte in HT1080 nachgewiesen werden, dass IGFBP-4 als Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalweges fungiert.

B Einleitung

B.1 Sarkome als Modell für Tumore mesenchymalen Ursprungs

B.1.1 Osteosarkom

Das Osteosarkom ist der häufigste primäre maligne Knochentumor, der vorwiegend bei jugendlichen Patienten vorkommt, wobei das Auftreten beim männlichen Geschlecht leicht überwiegt. Etwa 70 % der Fälle werden bis zum 30. Lebensjahr diagnostiziert. Die meisten Osteosarkome entstehen in der Metaphysenregion langer Röhrenknochen (60 % in der Knie-region: distaler Femur und proximale Tibia) (Krenn, Rüther 2012). Viele Osteosarkompatienten entwickeln während des Krankheitsverlaufes v. a. pulmonale Metastasen. Das „high-grade“ Osteosarkom ist charakterisiert durch hohe genetische Instabilität, was die Identifikation der zu Grunde liegenden genetischen Veränderung erschwert. Zahlreiche Zielgene verschiedener Signalwege sind für die Entstehung des Osteosarkoms von Bedeutung, einschließlich Notch, RAS/p21, MAPK, Jun/FOS und Wnt (Teicher 2012).

B.1.2 Fibrosarkom

Fibrosarkome gehören zu den Weichteilsarkomen, welche etwa 1 % aller Krebserkrankungen repräsentieren. Nach der aktuellen WHO-Klassifikation (WHO Classification of Soft Tissue Tumors) werden etwa 122 Entitäten unterschieden (Fletcher 2006). Die prinzipielle Einteilung basiert auf der Histogenese der Tumore: Fettgewebstumore, fibroblastische/myofibroblastische Tumore, fibrohistiozytäre Tumore, glattmuskuläre Tumore, perizytische (perivaskuläre) Tumore, skelettmuskuläre Tumore, vaskuläre Tumore, chondroossäre Tumore und Tumore ungewisser Differenzierung). Innerhalb der einzelnen histogenetischen Entitäten werden „benigne“, „intermediäre“ sowie maligne Tumoren unterschieden. Bei den Weichteilsarkomen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Malignomen, die in der Mehrzahl von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen abzuleiten sind. Etwa 75-85 % der Weichteilsarkome treten bei Erwachsenen auf, besonders im höheren Lebensalter (Krenn, Rüther 2012).

Das adulte Fibrosarkom ist eine seltene Diagnose. Tumore, welche früher als Fibrosarkome bezeichnet wurden, sind heutzutage klassifiziert als Fibromatose, pleomorphes Sarkom, ma-

ligner Tumor der peripheren Nervenhülle (MPNST) und synoviales Sarkom. Die Einteilung basiert auf speziellen immunhistochemischen und biochemischen/molekularbiologischen Techniken (van Vliet, Kliffen et al. 2009).

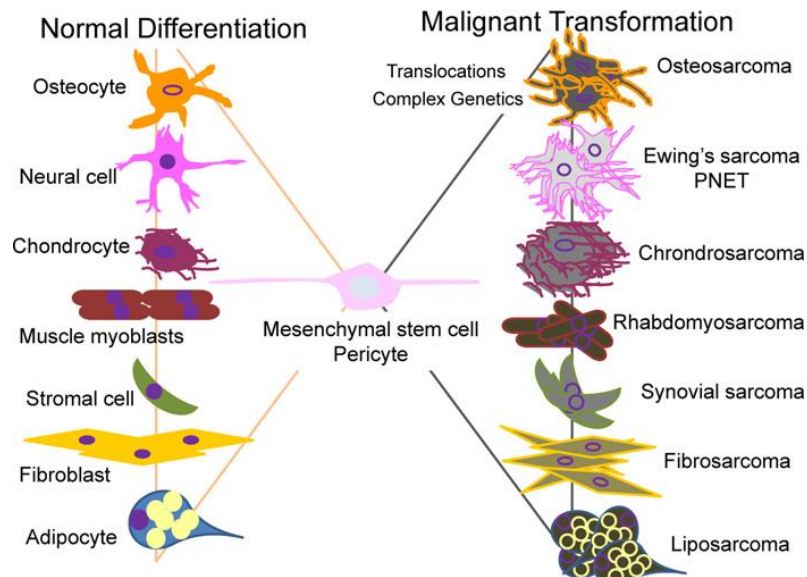


Abb. B-1: Differenzierungsformen mesenchymaler Stammzellen
Aus „Searching for molecular targets in sarcoma“ (Teicher 2012)

B.2 Die Wnt Signalwege - Funktion und Bedeutung

Derzeit unterteilt man die Wnt-vermittelten Signaltransduktionsprozesse in den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg und die jeweils nicht-kanonischen Wnt/PCP (*planar cell polarity*) und Wnt/ Ca^{2+} Signalwege, welche sich in der Weiterleitung des intrazellulären Signals unterscheiden. Ähnlichkeit besteht allerdings in ihrer Aktivierung, welche durch einen Liganden (Wnt-Proteine) an ihren Rezeptor, den sog. Frizzled-Rezeptor, geschieht.

Inzwischen wurde noch ein weiterer nicht-kanonischer Wnt-Signalweg gefunden, welcher Dwnd4, die Frizzled-Rezeptoren und PKC betrifft und die fokale Adhäsion der Zellen in Drosophila-Eiern reguliert (Cohen, Mariol et al. 2002).

Dem kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg kommt grundlegende Bedeutung während der embryonalen Entwicklung zu. Dort spielt er eine wichtige Rolle für die Differenzierung, Proliferation, Migration, Polarität und den Tod der Zellen (Miller 2002).

Im Erwachsenenalter kann eine fehlgesteuerte Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweges Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum verschiedener Tumore haben

(Polakis 2000; Miller 2002; van Es, Barker et al. 2003; Gregorieff and Clevers 2005) oder die Homöostase der Körperfunktionen beeinträchtigen und dadurch Erkrankungen wie zum Beispiel Osteoporose verursachen (Patel and Karsenty 2002; Levasseur, Lacombe et al. 2005).

Namensgebend für die Wnt-vermittelte Signaltransduktion ist ein Protein namens Wnt. Dieses wurde erstmals in der Maus entdeckt, als sich das *mouse mammary tumor virus* (MMTV) innerhalb des Lokus des Protoonkogens *Int1* integrierte und durch dessen Aktivierung zur Entstehung von Brustkrebs führte (Nusse and Varmus 1982).

In *Drosophila* entspricht *wingless* aufgrund der orthologen cDNA-Sequenz dem Maus *Int1* (Cabrera, Alonso et al. 1987; Rijsewijk, Schuermann et al. 1987). Eine Mutation in diesem *Int1*-Ortholog führte einerseits dazu, dass die Zellen der Keimscheiben anstelle eines Flügels ein „extra notum“ produzierten (Morata and Lawrence 1977), andererseits zu einer Störung der Anzahl und Polarität der Segmente (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980). Aus der Verschmelzung vom Maus- „*Int*“ und *Drosophila* -„*Wingless*“ ergab sich schließlich der Name Wnt (Nusse and Varmus 1992).

Im Frosch-Embryo wurde die Bedeutung von Wnt für die Achsenentwicklung dadurch deutlich, dass eine ektope Expression von Wnt-Genen eine Duplikation der Körperachse induzierte (McMahon and Moon 1989). Außerdem beeinflussten Veränderungen im Wnt-Gen die normale Gehirnentwicklung in Säugetieren auf negative Weise (McMahon and Bradley 1990).

Derzeit sind 19 verschiedene Wnt-Proteine bekannt, welche untereinander eine 27 - 83 %ige Homologie in der Aminosäuresequenz aufweisen (Miller 2002) und in einer Vielzahl von Organismen in konservierter Form vorliegen. Insgesamt weisen sie eine Länge von 350 – 380 Aminosäuren auf und werden als hydrophobe Proteine mit einer oder mehreren N-Glykosylierungen sezerniert. Daneben zeichnen sie sich durch eine hoch konservierte Verteilung von 23 oder 24 Cysteinen aus, welche in hoch konservierten Positionen angeordnet sind und eine für die Aktivität des Proteins wichtige Palmitylierung aufweisen (Nusse and Varmus 1992; Willert, Brown et al. 2003).

In funktioneller Hinsicht werden die Wnt-Proteine in transformierende bzw. nicht transformierende Wnts eingeteilt, je nachdem ob sie eine Transformation in der *mouse mammary epithelial cell line* C57MG induzieren und somit Brustkrebs hervorrufen können (Wong, Ga-

vin et al. 1994; Kuhl, Sheldahl et al. 2000; Kuhl, Sheldahl et al. 2000) und in *Xenopus*-Embryos zur Entwicklung einer zweiten Achse führen (Du, Purcell et al. 1995). Dem entsprechend zählen Wnt1, Wnt3, Wnt3a und Wnt7a zu den transformierenden, hingegen Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7b und Wnt11 zu den intermediär oder nicht-transformierenden Wnts (Kikuchi, Yamamoto et al. 2007).

Ursprünglich ging man davon aus, dass alle transformierenden Wnts intrazellulär β -Catenin stabilisierend wirken würden und somit nur kanonische Wnt-Signaltransduktion auslösen könnten. Dies wurde aber widerlegt, als Wnt3a auch ein β -Catenin-unabhängiges Signal induzierte (Kishida, Yamamoto et al. 2004; Endo, Wolf et al. 2005). Ebenso konnten nicht-transformierende Wnts, wie Wnt5a, welche früher für streng nicht-kanonisch gehalten wurden, je nach Rezeptorkontext β -Catenin stabilisieren und somit kanonisch wirken (Kuhl, Sheldahl et al. 2000).

In der embryonalen Entwicklung kommt vor allem dem kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg besondere Bedeutung zu. Der wichtigste Faktor seines intrazellulären Mechanismus ist die Stabilisierung von β -Catenin. Durch Wnt-Stimulation wird die Fähigkeit des Axin-APC-GSK3-Komplex dieses Protein zu phosphorylieren inhibiert und dieses dadurch nicht für die Degradation durch das Proteasom markiert (Kitagawa, Hatakeyama et al. 1999; Farr, Ferkey et al. 2000; Hinoi, Yamamoto et al. 2000; Salic, Lee et al. 2000). Im Zellkern führt das akkumulierte β -Catenin schließlich zur Transkription verschiedener Wnt/ β -Catenin-Zielgene (Miller 2002).

Die nicht kanonischen Wnt-Signaltransduktionswege regulieren vor allem die Migration und Polarität von Zellen, können aber auch Tumor-suppressiv wirken und den Wnt/ β -Catenin-Signalweg inhibieren (Kikuchi and Yamamoto 2008).

Der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg ist für Vorgänge der Zellproliferation und -migration verantwortlich (Veeman, Axelrod et al. 2003). Hierbei kommt es vor allem durch die Bindung von Wnt5a an Fzd2 zum intrazellulären Anstieg von Ca^{2+} wodurch einerseits die Enzyme Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II (CamKII) und classical proteinkinase C (cPKC) (Kuhl, Sheldahl et al. 2000; Kohn and Moon 2005), andererseits Phospholipase C und Phosphodiesterase (Slusarski, Corces et al. 1997; Ahumada, Slusarski et al. 2002) aktiviert werden. In beiden Signalkaskaden wird die Ca^{2+} -Freisetzung durch ein heterodimeres G-Protein vermittelt. Dies wird auf die Sensitivität des Signals gegenüber Reagenzien, welche spezifisch G-Protein-

Untereinheiten inhibieren (Pertussistoxin, GDP β und α -Transducin), zurückgeführt (Slusarski, Corces et al. 1997).

Des Weiteren kann der Wnt/Ca²⁺ Signalweg das Wnt/ β -Catenin-Signal negativ regulieren, indem der durch den CaMK II-vermittelten mitogen-activated protein-kinase Signalweg (MAPK), bestehend aus TAK1 MAPK und NLK MAPK, den T-cell factor (TCF) phosphoryliert und dadurch die Bindung von β -Catenin an diesen verhindert (Ishitani, Kishida et al. 2003).

Der Wnt/PCP-Signalweg wurde erstmals anhand seiner Rolle für die Zellbewegung während der Gastrulation und Neurulation im Zebrafisch beschrieben (Heisenberg, Tada et al. 2000). In Drosophila ist er verantwortlich für die Orientierung der Trichome oder Haare auf den Flügeln der ausgewachsenen Fliegen (Adler and Lee 2001).

Durch Bindung von Wnt11 an Fzd7 kommt es zur Aktivierung von Dishevelled (Dvl), welches zwei unabhängige Signale initiiert. Die Assoziation der kleinen GTPase Rho an Dvl und Daam bewirkt eine Aktivierung der Rho-Kinase (RhoK) (Habas, Kato et al. 2001), wohingegen über die weitere GTPase Rac die JUN N-terminale Kinase JNK aktiviert wird (Habas, Dawid et al. 2003).

Beim Dvl-atypischen Wnt/PKC-Signalweg entsteht ein Komplex zwischen Dvl und atypischem PKC, welcher durch Wnt5a β -Catenin-unabhängig aktiviert wird (Zhang, Zhu et al. 2007). Dadurch bildet sich ein weiterer Komplex zwischen atypischem PKC und Par3 und Par6, was die Zellpolarität reguliert (Suzuki and Ohno 2006).

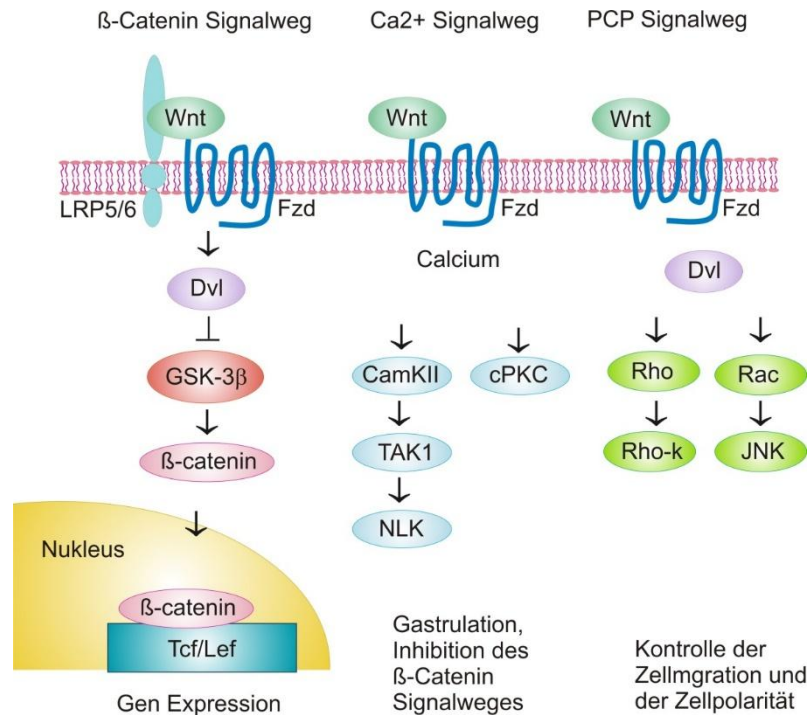


Abb. B-2: Übersicht über die drei verschiedenen Wnt-Signalwege

Abkürzungen: Dvl = Dishevelled, JNK = JUN N-terminale Kinase,
 GSK-3β = Glycogensynthasekinase-3β
 LRP = low-density-lipoprotein receptor-related protein
 NLK = NLK mitogen-activated proteinkinase
 PKC = Proteinkinase C, Rho-k = Rho-Kinase,
 TAK1 = TAK1 mitogen-activated protein kinase
 (modifiziert nach Kikuchi, Yamamoto, 2008)

Neben den Wnt-Proteinen gibt es noch weitere Modulatoren, welche Einfluss auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg nehmen. Darunter befinden sich Proteine, welche direkt am Liganden Wnt binden, und somit Einfluss auf dessen Wirkung haben. Zu diesen Faktoren gehören soluble Frizzled-related protein (sFRP) (Moon, Brown et al. 1997), Wnt-inhibiting factor 1 (WIF1) (Hsieh, Kodjabachian et al. 1999) und Cerebrus (Piccolo, Agius et al. 1999). Besonders sFRP gilt als potenter Antagonist des Wnt/β-Catenin Signalweges (Kawano and Kypta 2003). Seine Konzentration ist häufig in Karzinomen herabreguliert, wohingegen degenerative Erkrankungen ein erhöhtes Maß an sFRP aufweisen, was die Wichtigkeit der Kontrolle der Wnt-Aktivität bei derartigen Erkrankungen unterstreicht (Suzuki, Watkins et al. 2004; Marsit, Karagas et al. 2005).

B.3 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg und seine Komponenten

In Abwesenheit des Liganden Wnt wird β -Catenin von einem Degradationskomplex bestehend aus Axin, APC (Adenomatosis Polyposis Coli) und der Caseinkinase 1 α (CK1 α), welche Bestandteil der Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) ist, phosphoryliert (Ikeda, Kishida et al. 1998; Kikuchi 1999; Liu, Li et al. 2002). Das so markierte β -Catenin wird ubiquitiniert und schließlich durch das Proteasom abgebaut (Kitagawa, Hatakeyama et al. 1999).

Bindet hingegen Wnt an den Frizzled-Rezeptor und an dessen Ko-Rezeptoren low-density-lipoprotein receptor related protein 5/6 (LRP5/6) kommt es zur Rekrutierung von Axin zur Zellmembran (Tamai, Zeng et al. 2004) und somit zur Auflösung des Degradationskomplexes. Dadurch entgeht β -Catenin der Phosphorylierung (He, Semenov et al. 2004), akkumuliert in der Zelle und wandert schließlich in den Nukleus zur Kopplung an TCF/LEF-Bindungsstellen, um dort die Transkription spezifischer Wnt-Zielgene zu initiieren (Hurlstone and Clevers 2002).

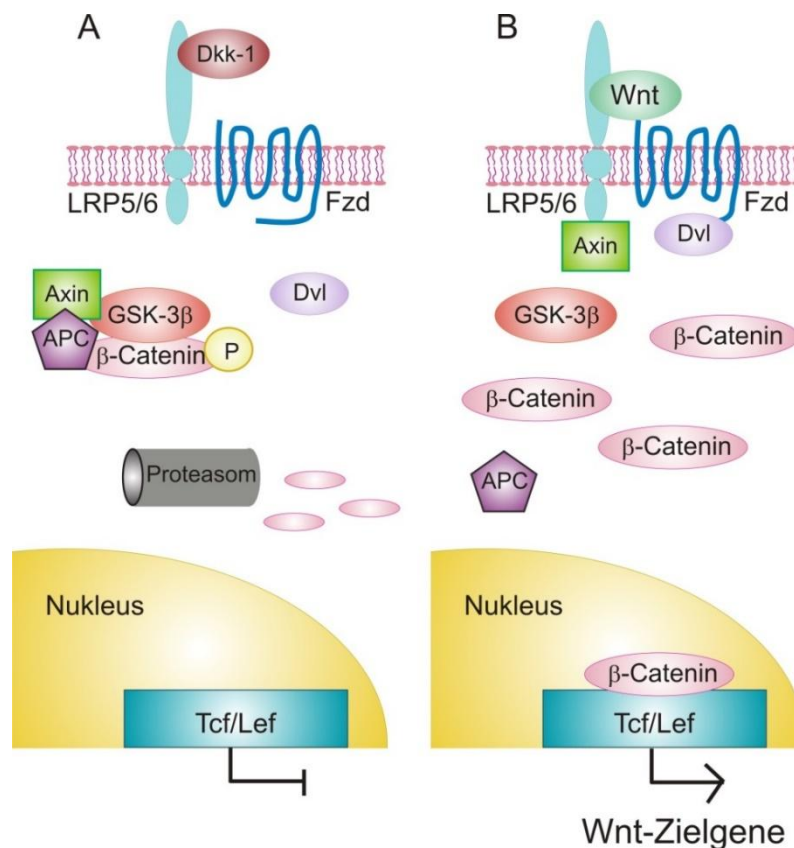


Abb. B-3: Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges

A) Nicht-aktivierter Zustand

B) Aktivierter Zustand

Abkürzungen: APC = Adenomatosis Polyposis Coli, Dkk-1 = Dickkopf 1, Dvl = Dishevelled, GSK-3 β = Glykogensynthasekinase-3 β , LRP = low-density-lipoprotein receptor-related protein, P = Phosphat (modifiziert nach Karow, 2008)

B.3.1 Frizzled-Rezeptoren (Fzd)

Frizzled-Gene wurden als erstes in *Drosophila* entdeckt. Dort fand man sie auf der Suche nach Mutationen, welche die Polarität epidermaler Haar- und Fühlerzellen im adulten Stadium von *Drosophila* unterbrechen (Chan, Karpf et al. 1992).

Im Wnt-Signalweg binden Wnt-Proteine an die Fzds (Bhanot, Brink et al. 1996), welche als G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wirken. Die Familie der Frizzled-Rezeptoren besteht aus 10 Fzds, Fzd 1-10 und SMOH, eine Rezeptor der am meisten von der Familie abweicht und Fzd2 nur zu 24 % ähnlich ist (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003).

Frizzled-Rezeptoren werden allgemein in vier Haupt-Cluster eingeteilt, welche untereinander verschiedene Ähnlichkeiten haben. So besteht zwischen Fzd1, Fzd2 und Fzd7 eine 75 %ige Identität. Fzd5 und Fzd8 weisen eine 70 %ige Gleichheit in der Aminosäure-Struktur auf. Wo hingegen zwischen Fzd4 und Fzd9 und 10 eine 65 %ige Ähnlichkeit besteht. Die geringste Homologie besteht zwischen Fzd3 und Fzd6. Sie beträgt beim Menschen 50 % (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003).

Frizzled-Proteine weisen eine Länge von 500-700 Aminosäuren auf, wobei der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist und Agonisten (Wnts) sowie Antagonisten (sFRP, WIF-1, Cerebrus, Dkk) binden kann. Diesem folgt eine hydrophobe Verbindungsregion von 40-100 Aminosäuren an die sich sieben transmembrane α -Helices anschließen. Diese transmembranen Domänen durchspannen die Lipiddoppelmembran sieben Mal und bilden drei intrazelluläre, sowie drei extrazelluläre Loops. Die intrazelluläre C-terminale Seite des Proteins kommuniziert mit nachfolgenden Elementen des Wnt-Signaltransduktionsweges und weist je nach Rezeptor eine unterschiedliche Länge auf (Wang, Macke et al. 1996; Morris and Malbon 1999).

Von besonderer Wichtigkeit für die Bindung des Liganden Wnt ist die CRD, welche aus 120-125 Aminosäuren mit zehn konservierten Cysteinen besteht, von welchen alle Disulfidbrücken bilden (Bhanot, Brink et al. 1996; Dann, Hsieh et al. 2001). Zusätzlich ergaben Strukturanalysen des Proteins, dass die CRD des Frizzled-Rezeptors eine konservierte dimere Berührungsfläche bildet (Dann, Hsieh et al. 2001).

Extrazellulär befindet sich zwischen dem Transmembran-Segment II und III, sowie IV und V konservierte Cystein-Reste, welche eine essentielle Disulfidbrücke im Rezeptormolekül bilden, was charakteristisch für GPCRs ist (Moxham and Malbon 1985).

Intrazellulär weisen zwei Aminosäuren nach der siebten hydrophoben Domäne ein KTXXXW-Motiv auf, welches hochkonserviert in den einzelnen Fzds ist und zusammen mit den intrazellulären Loop1 und Loop3 (Cong, Schweizer et al. 2004) als essentiell für die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges angesehen wird (Umbhauer, Djiane et al. 2000).

Das abschließende C-terminale Motiv „S/TXXXV“, welches eine Bindungsstelle von Proteinen mit der PDZ-Domäne darstellt (Kay and Kehoe 2004), ist in Frizzled -1, -2, -4, -5, -7, -8 und -10, aber nicht in den Rezeptoren -3, -6 und -9 vorhanden (Wang, Liu et al. 2006).

In einigen Modellen für frühe Entwicklungsstadien, z.B. Xenopus Embryos und F9 Teratom-Stammzellen der Maus, hat sich gezeigt, dass das Wnt-Signal, vermittelt durch Ratten-Frizzled-1, empfindlich gegenüber Pertussis-Toxin ist. Dieses Gift katalysiert spezifisch die kovalente ADP-Ribosylierung und Intoxikation von Mitgliedern der Gai/Gao-Familie (Liu, DeCostanzo et al. 2001), welche unter physiologischen Bedingungen zu einer Hemmung der Adenylatcyclase bzw. zur Aktivierung der Phospholipase C führen würden (Morris and Malbon 1999).

Neben dieser Erkenntnis weisen auch die drei grundsätzlichen strukturellen Merkmale der Fzds auf ihre Wirkung als GPCRs hin: (1) die extrazelluläre N-terminale Domäne, (2) der zentrale, transmembrane Kern und (3) schließlich den mindestens drei intrazellulären Loops und dem C-terminale Endstück, welche mit nachgeschalteten Signalelementen kommunizieren (Wang, Liu et al. 2006).

B.3.2 LRP5 und LRP6

Zusätzlich zu den Fzds sind im kanonischen Wnt/ β -Catenin Signal weitere Rezeptor-Proteine bekannt. Diese gehören der Subfamilie der low-density-lipoprotein (LDL) receptor related proteins (LRPs) an und werden in Wirbeltieren als LRP5 und LRP6 bzw. in Drosophila als Arrow (Arr) bezeichnet (Pinson, Brennan et al. 2000; Tamai, Semenov et al. 2000; Wehrli, Dougan et al. 2000).

Arrow/LRP5/LRP6 sind Typ I Transmembranproteine, deren Reste jeweils aus 1678, 1615 und 1613 Aminosäuren bestehen. LRP5 und LRP6 sind in ihrer intrazellulären Domäne zu 64 %, in ihrer extrazellulären Domäne zu 73 % identisch, während Arrow mit beiden eine Sequenzidentität von 40 % aufweist (He, Semenov et al. 2004).

In Co-Immunopräzipitationsexperimenten wurde festgestellt, dass LRP5 und LRP6 Wnt1, Wnt3a, Wnt4 und Xenopus Wnt8 binden können (Tamai, Semenov et al. 2000). Dies geschieht aber wohl mit schwächerer Affinität, als zwischen Wnt und den Fzds (He, Semenov et al. 2004). Zusätzlich sei angemerkt, dass Wnt-Proteine palmyliert und damit Lipoproteine sind. Diese Tatsache macht LRP5 und 6, die Mitglieder der LDLR-Familie sind, zudem zu wahrscheinlichen (Co-)Rezeptoren für Wnts (He, Semenov et al. 2004).

In genetischen Studien an Drosophila wurde festgestellt, dass Drosophila-Mutanten, denen das LRP-Homolog Arrow fehlt, phänotypisch Ähnlichkeiten mit der Wingless-Mutante aufweisen (Wehrli, Dougan et al. 2000). Außerdem zeigten Mäuse, welche kein LRP6 exprimierten ein ähnliches Erscheinungsbild, wie Mäuse mit Mutationen in mehreren Wnt-Genen (Pinson, Brennan et al. 2000). In Xenopus-Embryos wurde festgestellt, dass Frösche, welche dominant-negativ für LRP6 waren, eine Blockade des Wnt-Signal zeigten, wo hingegen eine Überexpression von LRP6 mit Wnt und Frizzled mit der Aktivierung des Wnt-Signals einherging (Tamai, Semenov et al. 2000).

Die Annahme, dass Arrow und LRP6 spezifisch für den kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg benötigt werden, wurde durch die Erkenntnis verstärkt, dass eine Verminderung der LRP6-Funktion in Xenopus keinerlei Auswirkungen auf dessen Gastrulation hatte (Semenov, Tamai et al. 2001), welche durch den Wnt/PCP Signalweg gesteuert wird (Heisenberg, Tada et al. 2000).

Besonders LRP6 scheint für das kanonischen Wnt/ β -Catenin Signal von Bedeutung zu sein. So sterben LRP6-defiziente Mäuse bereits um den Zeitpunkt der Geburt und weisen Defekte im Metencephalon, eine posteriore Achsenverkürzung und abnormale Anlagen der Gliedmaßen auf. All diese Defekte entsprechen Maus-Mutanten für Wnt1, Wnt3a und Wnt7 (Pinson, Brennan et al. 2000). Im Gegensatz dazu verlief bei LRP5-negativen Mutanten die Embryonal-Entwicklung normal. Sie wuchsen zu erwachsenen Tieren heran und waren fruchtbar, allerdings zeigten sie ein erhöhtes Maß an Osteoporose (Kato, Patel et al. 2002)

und anderen Stoffwechselerkrankungen (Fujino, Asaba et al. 2003; Magoori, Kang et al. 2003).

B.3.3 Signalweiterleitung über LRP und Fzds

Mao et al. konnten 2001 nachweisen, dass die intrazelluläre Domäne von LRP5 in Two-Hybrid- und Co-Immunopräzipitations-Assays das Protein Axin bindet (Mao, Wang et al. 2001). Später wurden diese Beobachtungen auch auf Arrow (Tolwinski, Wehrli et al. 2003) und LRP6 (Liu, Bafico et al. 2003; Tamai, Zeng et al. 2004) ausgeweitet. Für diese Bindung wurde die DIX Domäne von Axin als notwendig erkannt, wo hingegen die RGS-Domäne des Proteins eher inhibitorisch auf eine Bindung wirken soll (Mao, Wang et al. 2001; Tolwinski, Wehrli et al. 2003).

Sowohl in Arrow, als auch in LRP5 und LRP6 existiert ein Motiv, bestehend aus fünf Wiederholungen von PPP(S/T)P. Ein einziges dieser PPP(S/T)P-Motive kann im phosphorylierten Zustand das Wnt/ β -Catenin Signal in vollem Ausmaß auslösen (Tamai, Zeng et al. 2004). Daraus folgt, dass die Voraussetzung für die Bindung von Axin an den Co-Rezeptor dessen Phosphorylierung darstellt. Dazu dient das Enzym GSK3, das für seine Wnt-inhibierende Funktion im Degradationskomplex bekannt ist. Membrangebundenes GSK3 kann hingegen β -Catenin stabilisierend wirken, indem es das PPP(S/T)P-Motiv von LRP phosphoryliert, woraufhin anschließend die Caseinkinase 1 (CK-1 γ) eine weitere Phosphorylierungsstelle von LRP phosphoryliert (Davidson, Wu et al. 2005; Zeng, Tamai et al. 2005).

B.3.4 Frizzled und Dishevelled (Dvl)

Das Protein Dishevelled kommt sowohl im Wnt/ β -Catenin als auch im Wnt/PCP downstream des Fzd-Rezeptor vor (Boutros, Paricio et al. 1998). Ähnlich wie bei Axin liegen in diesem Protein eine DIX-Domäne und zusätzlich noch eine PDZ- und eine DEP-Domäne vor. Nach der Aktivierung des Frizzled-Rezeptors wird Dvl zur Plasmamembran rekrutiert (Axelrod, Miller et al. 1998; Rothbacher, Laurent et al. 2000) und bindet mit seiner PDZ-Domäne direkt an die carboxyterminale Region des Fzd-Rezeptors (Wong, Bourdelas et al. 2003).

B.4 Aktivierung spezifischer Wnt-Target-Gene

B.4.1 TCF/LEF

Durch Phosphorylierung stabilisiertes β -Catenin gelangt in den Zellkern und bindet an die Transkriptionsfaktoren „lymphoid enhancer factor-1/T-cell factor-1“, wodurch die Transkription spezifischer Wnt-Target-Gene gesteuert wird. TCF/LEF und zwei andere murine Homologe TCF-3 und -4 (Korinek, Barker et al. 1998) binden spezifisch an die Nukleotidsequenz 5'-CTTTGWW-3' (Travis, Amsterdam et al. 1991; van de Wetering, Oosterwegel et al. 1991; Watterman, Fischer et al. 1991), was zu einer Beugung der DNA um 130° führt (Giese, Cox et al. 1992; Love, Li et al. 1995). Dabei sind für die Funktion der Transkriptionsfaktoren TCF/LEF ihre verschiedenen Domänen notwendig. N-terminal befindet sich die β -Catenin-Bindungsdomäne, an die sich die context-dependent regulatory domain (CRD) anschließt (Arce, Yokoyama et al. 2006). Diese besitzt hauptsächlich regulatorische Wirkung, indem sie den TCF/LEF-Co-Repressor Groucho (transducin-like enhancer of split TLE, beim Menschen) rekrutiert (Cavallo, Cox et al. 1998; Levanon, Goldstein et al. 1998; Roose, Molenaar et al. 1998). Die folgende HMG (high-mobility group DNA-binding domain) Domäne bindet schließlich an die Konsensussequenz der DNA (van de Wetering, Oosterwegel et al. 1991; Giese, Cox et al. 1992; Love, Li et al. 1995), wobei die NLS (nuclear localisation signal) Domäne den Transport von TCF/LEF in den Nukleus steuert.

B.4.2 Regulation der TCF/LEF-Proteine

In Abwesenheit des Wnt-Signals und somit fehlender β -Catenin-Stabilisierung kann TCF/LEF aktiv die Transkription unterdrücken (Brannon, Gomperts et al. 1997; Riese, Yu et al. 1997; Bienz 1998). Dies geschieht vor allem über Groucho/TLE, welches zwischen der Mitte der CRD und dem Ende des Proteins bindet (Brantjes, Roose et al. 2001; Daniels and Weis 2005). An dieser Stelle wurde auch eine zweite β -Catenin-Bindungsstelle gefunden, welche vermuten lässt, dass überlappende Bindungsstellen kompetitive Interaktionen zwischen β -Catenin und Groucho (Gro)/TLE bewirken (Daniels and Weis 2005).

B.5 Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf die Tumorentstehung

Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg hat starken Einfluss auf die Proliferation von Zellen. Dies zeigt sich an zweien seiner Zielgenen: Cyclin D1 und c-myc (Roel Nusses Web-Page: <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). Wobei die Cycline (D1, D2, D3) dafür bekannt sind, Regulatoren der *cyclin-dependent-kinase 4* (CDK4) und CDK6 zu sein, welche im Zellzyklus einen Übergang der G1 in die S-Phase bewirken (Qie and Diehl 2016), liegt C-myc ein Transkriptionsfaktor zugrunde, welcher eine Reihe von Genen transkribiert, die unter anderem für die Zellproliferation zuständig sind (Stine, Walton et al. 2015). Eine Tumorentstehung bei Dysregulation ist somit naheliegend.

B.5.1 Intrazelluläre Mechanismen

Die familiäre Adenomatosis Coli (FAP) ist eine seltene erbliche Erkrankung, bei welcher die Patienten hunderte bis tausende Polypen des Colons entwickeln. Ohne chirurgische Resektion kommt es bei einigen Polypen zu maligner Entartung. 1987 erkannte man, dass FAP mit einer Deletion in der Chromosomenregion 5q21-22 assoziiert ist (Bodmer, Bailey et al. 1987; Leppert, Dobbs et al. 1987). Zwei Jahre später entdeckte man Nonsense-Mutationen im entsprechenden Protein APC welche sowohl FAP-Patienten als auch Patienten mit sporadischen kolorektalen Karzinomen aufwiesen (Ashton-Rickardt, Dunlop et al. 1989; Groden, Thliveris et al. 1991; Kinzler and Vogelstein 1996). Viele APC-Mutationen sind *frameshift*-, *nonsense*- oder *splice-site*-Mutationen (Polakis 2000) und für die Entstehung der FAP ist immer eine zweite Mutation (second hit) nötig. Die APC-Mutationen akkumulieren vor Regionen, welche für die so genannten SAMP-Wiederholungen codieren. Diese Regionen interagieren mit Axin I und Axin II und sind somit essentiell für den Degradationskomplex des β -Catenin (Behrens, Jerchow et al. 1998; Hart, de los Santos et al. 1998). Gleichzeitig wurden in kolorektalen Karzinomen in seltenen Fällen auch *loss-of-function* Mutationen von Axin I und Axin II gefunden (Liu, Dong et al. 2000; Satoh, Daigo et al. 2000).

Inzwischen wurde auch das Gen für β -Catenin CTNNB1 bezüglich karzinogener Mutationen untersucht. Diese betreffen neben dem Kolonkarzinom (Morin, Sparks et al. 1997) auch maligne Melanome (Rubinfeld, Robbins et al. 1997), hepatozelluläre Karzinome (Polakis 2007), Wilms-Tumore (Koesters, Ridder et al. 1999) und andere. Dabei wurden die entsprechenden Mutationen hauptsächlich im N-Terminus des Gens gefunden (Polakis 2000; Schwarz-

Romond, Asbrand et al. 2002). Diese Mutationen verursachen entweder einen Deletion des N-terminalen Fragmentes oder eine Veränderung der N-terminalen Phosphorylierungsstelle.

B.5.2 Extrazelluläre Mechanismen

Auch extrazelluläre Mechanismen können im Falle einer Dysregulation zu unkontrollierter Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges führen und damit die Entstehung von Karzinomen begünstigen. Besonders sFRP's (secreted Frizzled-related proteins) können als Tumorsuppressoren fungieren. Es zeigte sich, dass in verschiedenen Tumoren Deletionen und „loss of heterozygosity“ (LOH) in diesen Regionen vorliegen (Leach, Banga et al. ; Finch, He et al. 1997; Brennan, Gonzalez-Sancho et al. 2004). So zeigten sich LOH's in der chromosomalen Region von SFRP3 oft beim Lungenkarzinom, kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen und Neuroblastomen (Leyns, Bouwmeester et al. 1997; Schmitt, Millar et al. 2002; Wolf, Mousses et al. 2004). Außerdem konnte auch transkriptionelle Inaktivierung in Form von Hypermethylierung der Promoterregion der SFRP's in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Suzuki, Gabrielson et al. 2002; Fukui, Kondo et al. 2005; Zou, Molina et al. 2005). Gleichzeitig gibt es auch Studien, welche darauf hinweisen, dass sFRP1 das Zellwachstum unter bestimmten Umständen stimulieren kann (Uren, Reichsman et al. 2000). So zeigte sich in Zellen des malignen Glioms, dass ektope Expression von sFRP2 das Wachstum des intrakranialen Tumors fördert (Roth, Wild-Bode et al. 2000).

Aber auch die Aktivierung von bestimmten Fzd-Rezeptoren zeigt Einfluss auf die Tumorentstehung. Im humanen hepatozellulären Karzinom wies man eine verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges über Frizzles 7 und Wnt3 nach (Kim, Lee et al. 2008).

B.6 Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-4 (IGFBP-4)

B.6.1 Funktion und Bedeutung

Das IGF-System besteht aus den zwei Peptiden IGF-I und IGF-II, zwei Rezeptoren IGF-IR und IGF-IIR sowie sechs verschiedenen IGF-Bindungsproteinen IGFBP I-VI. Zusätzlich sind noch vier verschiedene IGFBP verwandte Peptide IGFBP Rp 1-4 bekannt (Durai, Davies et al. 2006).

Die Komponenten des IGF-Systems werden innerhalb des Körpers in verschiedenen Flüssigkeiten und Geweben gefunden (Rajaram, Baylink et al. 1997; Zhou, Diehl et al. 2003). Dabei wirken sie auf autokrine, parakrine und endokrine Art (Grimberg and Cohen 2000) und regulieren Proliferation, Transformation, Differenzierung und apoptotische Prozesse von Zellen (Leng, Leeding et al. 2001; Moschos and Mantzoros 2002).

IGFBP-4 ist mit einer Größe von 237 Aminosäuren das kleinste der IGFBPs (Hwa, Oh et al. 1999; Zhou, Diehl et al. 2003). Seine Aufgabe liegt einerseits in der IGF-abhängigen Regulation von IGF-I und -II, andererseits in IGF-unabhängigen Wirkungsweisen. IGF-abhängig hemmt es hauptsächlich die wachstumsfördernde Wirkung von IGF, wobei es dessen Bindung an seinen IGF-I Rezeptor behindert (Mohan, Nakao et al. 1995). In vivo Experimente in Mäusen zeigen, dass IGFBP-4 als funktioneller Antagonist zu IGF-I bei der Entstehung glatter Muskelzellen wirkt (Wang, Niu et al. 1998). Außerdem inhibiert es Zellproliferation und stimuliert die Apoptose in lymphoiden Geweben, ohne dabei jedoch deren Differenzierung zu beeinträchtigen (Zhou, Flaswinkel et al. 2004). Zusätzlich zu seiner antiproliferativen Wirkung korreliert es in Tumorzellen mit deren Differenzierungsstatus (Shen and Singh 2004).

Wie alle Mitglieder dieser Superfamilie enthält das Protein zahlreiche Cystein-Reste (20) in verschiedenen Regionen (Qin, Strong et al. 1998) und liegt im Serum sowohl in nicht-glykosylierter als auch in einer N-glykosylierten Form vor (Ceda, Fielder et al. 1991; Cheung, Smith et al. 1991; Kelley, Oh et al. 1996), wobei die Glykosylierung die Bindung des Proteins an IGF-I nicht zu beeinträchtigen scheint (Chelius, Baldwin et al. 2001).

Für die hohe Affinität zur IGF-Bindungsdomäne ist hingegen die N-terminale Leu(72)-Ser(91) sowie die C-terminale Cys(205)-Val(214) – Sequenz von großer Bedeutung (Qin, Strong et al. 1998).

Neben seinem Hauptproduktionsort, der Leber (Mazerbourg, Callebaut et al. 2004), ließ sich IGFBP-4 auch in adrenergen Drüsen (Ilvesmaki, Blum et al. 1993), den Leydig-Zellen des Hodens (Zhou and Bondy 1993) und im sich entwickelnden Embryo (Cerro, Grewal et al. 1993) nachweisen.

Der Einfluss von IGFBP-4 auf die Entwicklung von Neoplasien wird dadurch deutlich, dass einigen Tumorzelllinien das Protein exprimieren (Ceda, Fielder et al. 1991; Bostedt, Schmid et al. 2001; Yi, Hwang et al. 2001). Gleichzeitig konnte aber auch nachgewiesen werden, dass

eine Überexpression von IGFBP-4 das Wachstum des Prostata-Karzinoms reduziert (Damon, Maddison et al. 1998).

B.6.2 IGFBP-4 als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin Signalweges

Zhu et al. machten eine von IGF-unabhängige Wirkung von IGFBP-4 für die Wnt-Forschung interessant, als sie nachwiesen, dass IGFBP-4 in P19CL6-Zellen cardiomyocytische Differenzierungsprozesse induziert (Zhu, Shiojima et al. 2008) und gleichzeitig spezifisch das kanonische Wnt-Signal inhibiert. Dabei stellte sich heraus, dass die hemmende Wirkung von IGFBP-4 auf spezifische Wnt-Zielgene über die Zelloberfläche und zwar über Interaktion mit der N-terminalen Domäne von LRP6 und der CRD des Frizzled 8-Rezeptors vermittelt wird und damit kompetitiv die Bindung von Wnt3a gehemmt wird.

Dies führt zu der Annahme, dass IGFBP-4 als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin Signalweges auch Einfluss auf tumorbiologische Prozesse haben könnte (Durai, Davies et al. 2006).

C Fragestellung und Zielsetzung

Um die Rolle der Frizzled-Rezeptoren als putative Anti-Tumor Targets weiter zu charakterisieren, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst geklärt werden, in welchem Maße die verschiedenen Fzd-Rezeptoren in den Tumorzellen mesenchymalen Ursprungs (SAOS-2 und HT1080) exprimiert werden.

Um den Einfluss eines Fzd-Knockdowns auf das Invasionsverhalten der Zellen zu eruieren, sollte ein Invasionsassay für beide Zell-Linien etabliert werden.

Darüber hinaus sollten für HT1080 entsprechende Bedingungen optimiert werden, um mit einem TCF/LEF-Reportersystem die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin nach Knockdown einzelner Frizzled-Rezeptoren erfassen zu können.

Hierbei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Auswirkung hat der Knockdown von Fzd 1-7 auf die Reporter-gen-Aktivität?
2. Welche Auswirkung hat der Ko-Knockdown von Fzd 1 und 3 sowie Fzd 3 und 5 auf die Reporter-gen-Aktivität?

Nachdem sich in qRT-PCR-Analysen gezeigt hatte, dass Fzd8 in HT1080 in erhöhtem Maße exprimiert wurde, sollten mittels geeigneter experimenteller Ansätze folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie beeinflusst ein Knock-Down von Fzd8 das Invasionsverhalten von HT1080?
2. Wie beeinflusst ein Knock-Down von Fzd8 das Proliferationsverhalten von HT1080?
3. In welcher Abhängigkeit steht die Expression von Fzd8 von Wnt3a?

IGFBP-4 ist ein für Cardiomyozyten-Progenitorzellen bekannter Inhibitor des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges, welcher über Fzd8 und den Ko-Rezeptor LRP6 fungiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren deshalb nachfolgende Fragestellungen von Interesse:

1. Wird in HT1080 neben Fzd8 auch LRP6 exprimiert?
2. Welchen Einfluss hat IGFBP-4 auf das etablierte Zielgen des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges Cyclin D1 in HT1080?
3. Welchen Einfluss hat IGFBP-4 auf die Reporter-gen-Aktivität in TCF/LEF-HT1080?

D Material und Methoden

D.1 Geräte und Material

D.1.1 Geräte

■ Autoklav 3850	Systec GmbH, Wettenberg
■ Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
■ CO ₂ -Inkubator Galaxy S	RS Biotech, England
■ Eismaschine AF-10	Scotsman, Italien
■ Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur	PeqLab, Erlangen
■ Gel-Bilderfassungssystem Intas Gel Imager	Intas, Göttingen
■ Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
■ Hybridisierungssofen, Hybridizer HB-100	UVP, Laboratory Products, USA
■ Image Scanner	Pharmacia, Freiburg
■ Kühlschrank (4° C)	Siemens, München
■ Magnetrührer Ika-Combimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen
■ Mikroskop IX50 mit	Olympus, Feldkirchen-Westerham
• CCD Kamera Typ 3CCD	Sony, Köln
• UV-Lampe U-RFL-T	Olympus, Feldkirchen-Westerham
■ Mikroskop IX70 mit	Olympus, Feldkirchen-Westerham
• POC Chamber	Pecon, Erbach
• SensiCam QE	PCO CCD Imaging, Kehlheim
• Tempcontrol 32-2	Pecon, Erbach
• Uniblitz VCM-D1 Shutter	Vincent Associates, USA
• UV-Lampe BH2-RFL-T3	Olympus, Feldkirchen-Westerham
■ Mikrowellenofen R-6270	Sharp, Japan
■ Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
■ Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
■ Orbitalschüttler Certomat R	Braun Biotech International, Melsungen
■ Infrons TR150 mit	Infrons AG, Schweiz

• Heissluft Inkubatorofen ITE	Infrons AG, Schweiz
■ PCR Thermal Cycler:	
• Gene Amp 2400	Perking Elmer, Langen
• LightCycler II	Roche, Mannheim
• Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
■ pH-Meter:	
• Typ 526 mit pH Elektrode	WTW, Weilheim
■ Pipetus-akku	Hierschmann Laborgeräte, Eberstadt
■ Proteintransfereinheiten:	
• Mini Protean Electrophoresis Cell	BioRad, München
• Mini Trans Blot Electrophoretic	BioRad, München
• Transfer Cell	BioRad, München
■ Sicherheitswerkbänke:	
• BDK 7419, Modell UVF 6.18S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
• Herasafe Typ HS12	Heraeus Instruments, Göttingen
■ Spannungsquellen:	
• Consort E143	PeqLab, Erlangen
• Mighty Slim	Hoefer, Heidelberg
■ Stickstofftank Locator 4	Sigma, Taufkirchen
■ Spectrofluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
■ Tiefkühlgefrierschrank:	
• Colora UF 85-300S (-80° C)	Colora, Lorch
• Liebherr Premium Frost (-20° C)	Liebherr, Ochsenhausen
■ Transluminator DarkReader	Clare Chemical Research, USA
■ Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching
■ Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
■ Waagen:	
• Analysenwaage, A 120 S	Satorius, Göttingen
• Technische Waage, MA AF200	Satorius, Göttingen
■ Wärmeschränke:	
• B30	Memmert, Schwabach
• BE30	Memmert, Schwabach

■ Wasserbäder:

- WB-14 Memmert, Schwabach

■ Exatherm U3electronic Julabo, Seelbach

■ Wasserdeionisierungseinheit Membrapure MembraPURE, Bodenheim

■ Zentrifugen:

- Varifuge 3.0 R Heraeus Sepatech, München
- Sepatech Biofuge 15 Heraeus Sepatech, München
- Eppendorf 5415 D Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- Kühlzentrifuge, Eppendorf 5415 R Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

D.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel

■ Image Master Labscan 3.0 Pharmacia, Freiburg

■ Image Quest QV 770 Intas, Göttingen

■ LightCycler Software 3.5 Roche, Mannheim

■ SECentral SciEDSoftware, USA

■ XFluor4 Safire2 Tecan, Crailsheim

Für die Identifikation von potentiellen siRNA-Sequenzen wurden die mRNA-Transkripte (NCBI Nucleotide Datenbank, Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) der zu regulierenden Zielgene mit den Online-Programmen siRNA Target Finder (Genscript, Piscataway, USA; <http://www.genscript.com/ss-bin/app/rnail>) und siRNA Design Tool (Qiagen, Hilden; <http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilecing/CustomSiRna/SiRnaDe-signer.aspx>) analysiert und passende siRNAs ermittelt.

Die Auswahl der Primersequenzen für die quantitative RT-PCR unter Verwendung der Universal Probe Library-Sonden erfolgte mit Hilfe der dafür auf der Homepage der Firma Roche zur Verfügung gestellten Software (<http://www.rocheappliedscience.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>).

D.1.3 Chemikalien und Reagenzien

■ Agarose, Nusive	Biozym, Hameln
■ β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
■ CyQuant Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes, USA
■ DNA Molekulargewichtsmarker, Generuler 1 kb	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot
■ Ethanol	Merck, Darmstadt
■ Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
■ Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
■ LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
■ LightCycler TaqMan Master	Roche, Mannheim
■ QIAshredder	Qiagen, Hilden
■ Quantitect Reverse Transcription-Kit	Qiagen, Hilden
■ Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
	Roche, Mannheim

D.1.4 Vektoren

pEGFP-N3 (BD Clontech, USA)

Das Plasmid pEGFP-N3 kodiert für ein spezielles Derivat des grün fluoreszierenden Proteins (*enhanced green fluorescent protein* EGFP) der Qualle *Aequoria victoria*. Dieses wurde hinsichtlich der Expression und einer stärkeren Fluoreszenz für Säugetierzellen optimiert. Somit kann u.a. die exakte Lokalisation von EGFP-transgenen Zellen bestimmt werden. Darüber hinaus kann in das Plasmid ein zusätzliches Transgen in die *multiple cloning site* (MCS) am 5'-Ende der EGFP-kodierenden Sequenz eingebracht werden, so dass eine Fusion des Transgens mit dem N-Terminus des EGFP entsteht. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte über Neomycin, die der transformierten *E. coli* über Kanamycin.

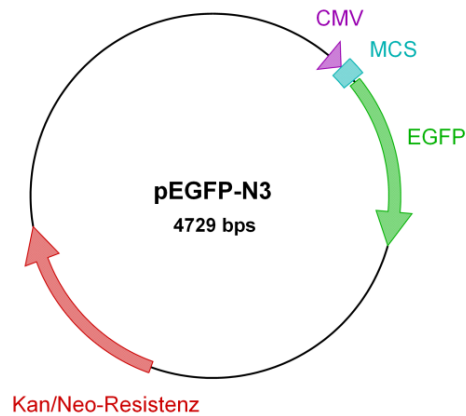


Abb. D-1: Vektorkarte des Reporterplasmids pEGFP-N3

CMV: Cytomegalie Virus

EGFP: *enhanced green fluorescent protein*

MCS: *multiple cloning site*

Kan: Kanamycin

Neo: Neomycin

pN3-BAR-GLuc

Bei dem Vektor pN3-BAR-GLuc handelt es sich um ein Reportersystem, welches dem Nachweis von β -Catenin-abhängiger Expression dient. Als Reporterprotein fungiert hierbei eine sezernierte Form der Luciferase (Gaussia Luciferase, GLuc), die unter der Kontrolle eines minimalen Thymidin-Kinase Promotors (pTkmin) aus dem Herpes simplex Virus steht. Dieser wird erst dann aktiv, wenn β -Catenin im Komplex mit Tcf/Lef an die ihm vorgeschalteten 12 Tcf/Lef-Bindungsstellen (TCAAAGG) bindet. Diese Konsensus-Sequenzen sind wiederum durch Spacer-Nukleotide unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander getrennt, um den Transkriptions-Komplexen den entsprechenden Raum zu gewähren. Das Vektor-Rückgrad besteht aus dem pEGFP-N3-Vektor der Firma BD Clontech (USA), wobei die kodierende Sequenz für EGFP zunächst entfernt worden war. In dessen *multiple cloning site* wurden anschließend die 12 x Tcf/Lef-DNA-Sequenzen eingebracht.

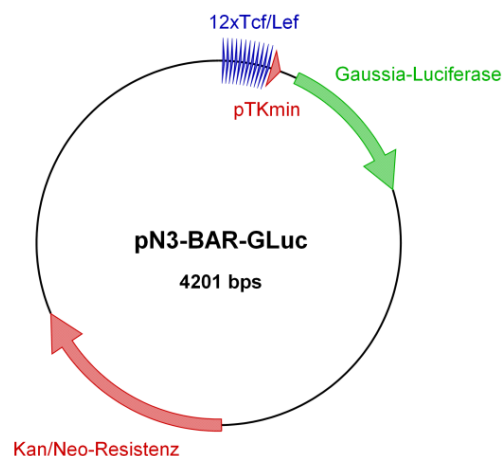


Abb. D-2: Vektorkarte des Reporterplasmids pN3-BAR-GLuc

BAR : β -catenin activated reporter

GLuc: Gaussia Luciferase

Kan: Kanamycin

Lef: lymphoid enhancer-binding factor

Neo: Neomycin

pTkmin: Thymidin-Kinase Promotor

Tcf: T-cell-specific transcription factor

D.1.5 Primer für die quantitative RT-PCR

Die Primer für die qRT-PCR im Falle von Cyclin D1 und GAPDH wurden von der Fa. Search LC (Heidelberg) bezogen. Die Quantifizierung erfolgte hierbei mit Hilfe des SYBR Green I Farbstoffes und des entsprechenden Kits *LightCycler FastStart DNA Master* der Firma Roche.

Der quantitative Nachweis der 10 Frizzled Rezeptoren in SAOS-2 und HT1080 wurde unter Verwendung der *Universal Probe Library* Sonden und des dazu benötigten Kits *Light Cycler TaqMan Master* (Roche) durchgeführt. Die Auswahl der Primer erfolgte hierbei unter Zuhilfenahme der *ProbeFinder* Software (Roche). Die entsprechenden Primer wurden von der Fa. Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Tab. D-1: Primer für die TaqMan qRT-PCR

Gen	Genbank-ID:	Sequenz: Forward-Primer Reverse-Primer	Bindungs- region mRNA	bp
Fzd1	NM_003505	5'-(GAACTCCACAAACCTTCCAAA)-3' 5'-(CGAGCAAGGGAGGAATTGTA)-3'	3000-3020 3044-3063	64
Fzd2	NM_001466	5'-(CCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCT)-3' 5'-(GCAGCCCTCCTTCTTGGTG)-3'	754-779 1095-1113	359
Fzd3	NM_017412	5'-(GGCTATGGTGGATGATCAAA)-3' 5'-(TAACTGCAGGGCGTGACCT)-3'	2173-2193 2264-2283	111
Fzd4	NM_012193	5'-(ACACCGCTCATCCAGTACG)-3' 5'-(TGCACATTGGCACATAAACA)-3'	247-265 300-319	73
Fzd5	NM_003468	5'-(CCTGGAGGTGCACCAGTT)-3' 5'-(TGGGCGTGATACATAGAGCAT)-3'	192-209 258-277	86
Fzd6	NM_003506	5'-(GAAGCAAAAAGACATGCACAGA)-3' 5'-(TTCGACTTTCACTGATTGGATCT)-3'	1760-1781 1815-1837	78
Fzd7	NM_003507	5'-(AAGCGGTTTGGATGAAAAGA)-3' 5'-(GATTCACATCGCCGTTATCA)-3'	1976-1995 2024-2043	68
Fzd8	NM_031866	5'-(CGCCACGCGTTAATTTCT)-3' 5'-(ATCTCGGGTTCTGGAAACG)-3'	2336-2353 2381-2399	64
Fzd9	NM_003508	5'-(GGTCCTGACGCTCACCTG)-3' 5'-(AGGCAGCCATGTGGAAATAG)-3'	1225-1242 1297-1316	92
Fzd10	NM_007197	5'-(TTGGTTTTCCAGCGAAGG)-3' 5'-(CCACAAATTAGTTACACAAGAGGCTA)-3'	2400-2417 2436-2461	62

D.1.6 Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken

D.1.6.1 Chemikalien und Materialien

■ Ampicillin Natrium-Salz	Merck, Darmstadt
■ Bacto Agar	BD Bioscience, USA
■ Bacto Hefeextrakt	BD Bioscience, USA
■ Bacto Trypton	BD Bioscience, USA
■ D-Glukose	Sigma, Deisenhofen
■ Erlenmeyerkolben 100, 250 und 1000 ml	Wagner und Munz, München
■ Glycerin	Serva, Heidelberg
■ Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
■ Petrischalen, Polystyrol 9 cm Ø	Greiner, Nürtingen

D.1.6.2 Bakterienstämme

Zur Amplifikation bzw. zur Kryokonservierung in der Stammsammlung wurden die Plasmide in die unten aufgeführten *E. coli*-Stämme transformiert.

JM 109 (NEB, Frankfurt)

Genotyp: F' traD36 proA+B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 endA1 thi hsdR17

XL-10 Gold (Stratagene, USA)

Genotyp: Tetr Δ(mcrA) 183Δ(mcrCB-hsdSNR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10(Tet^R) Amy Cam^R]

D.1.7 Chemikalien und Materialien für zellbiologische Techniken

D.1.7.1 Chemikalien und Materialien

■ β-Glycerolphosphat	Sigma, Deisenhofen
■ Costar-Transwell-Filter 6,5 mm, 5 µm Poren Ø	Corning, Niederlande
■ Costar-Transwell-Filter 6,5 mm, 8 µm Poren Ø	Corning, Niederlande

■ Diff-Quick	Medion Diagnostic, Schweiz
■ DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Österreich
■ DMSO	Merck, Darmstadt
■ FCS	Sigma, Deisenhofen
■ Genitacin	Sigma, Deisenhofen
■ Glycerol	Merck, Darmstadt
■ hECM	BD Biosciences, USA
■ Humanserum	PAA, Österreich
■ Isopropanol	Merck, Darmstadt
■ LiCl	Sigma, Deisenhofen
■ Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
■ McCoy's 5A Medium	PAA, Österreich
■ Nutridoma (Serumersatz)	Roche, Mannheim
■ PBS	PAA, Österreich
■ Penicillin/Streptomycin	PAA, Österreich
■ Pyrex Cloning Cylinders 8 x 8 mm	Corning, Niederlande
■ siRNA-Puffer	Qiagen, Hilden
■ Trypsin-EDTA, 10 x	PAA, Österreich
■ Zellkulturgefäße und – platten	Nunc, Wiesbaden Corning, Niederlande

D.1.7.2 siRNAs**Tab. D-2: siRNAs zur Transfektion von SAOS-2 und HT1080**

siRNA	Genbank-ID	Position auf der mRNA	Ziel-Sequenz Sense-Sequenz Antisense-Sequenz
Negativ-Kontrolle (nc)	-		5'-r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)d(TT)-3' 5'-r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)d(TT)-3'
β-Catenin	NM_001904	1111 - 1131	5'-AATGGTTGCCTTGCTCAACAA-3' 5'-r(UGGUUGCCUUGCUCUACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUUGAGCAAGGCAACCA)d(TT)-3'
Fzd1	NM_003505	784 - 802	5'-(AAGCACGGACATCGCGTACAA)-3' 5'-r(GCACGGACAUCGCGUACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUACGCGAUGUCCGUGC)d(TT)-3'
Fzd2	NM_001466	1687 - 1706	5'-(AACGGTCTACATGATCAAATA)-3' 5'-r(CGGUCUACAUGAUCAAAUA)d(TT)-3' 5'-r(UAUUUGAUCAUGUAGACCG)d(TT)-3'
Fzd3	NM_017412	584 - 602	5'-(AATGCCAAGATTTGCCTTATA)-3' 5'-r(UGCCAAGAUUUGCCUUAUA)d(TT)-3' 5'-r(UAUAAGGCAAAUCUUGGCA)d(TT)-3'
Fzd4	NM_012193	1380 - 1400	5'-(AACCATTGTCATCTTGATTAT)-3' 5'-r(CCAUUGUCAUCUUGAUUUAU)d(TT)-3' 5'-r(AUAAUCAAGAUGACAAUGG)d(TT)-3'
Fzd5	NM_003468	844 - 862	5'-(AATCCTCTGCATGGATTACAA)-3' 5'-r(UCCUCUGCAUGGAUUACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUAAUCCAUGCAGAGGA)d(TT)-3'
Fzd6	NM_003506	2063 - 2082	5'-(AACAAGAACTTTGACAGAAA)-3' 5'-r(CAAGAAACUUUGACAGAAA)d(TT)-3' 5'-r(UUUCUGUCAAAGUUUCUUG)d(TT)-3'
Fzd7	NM_003507	2856 - 2876	5'-(AAGGAAATGTAAGAGGTTTTG)-3' 5'-r(GGAAAUGUAAGAGGUUUUG)d(TT)-3' 5'-r(CAAAACCUCUUACAUUUUCC)d(TT)-3'
Fzd8 #1	NM_031866	441 - 460	5'-(AACTCTGTGCATGGACTACAA)-3' 5'-r(CUCUGUGCAUGGACUACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUAGUCCAUGCACAGAG)d(TT)-3'
Fzd8 #2	NM_031866	1770 - 1789	5'-(AAGTACTTCATGTGCCTAGTA)-3' 5'-r(GUACUUCAUGUGCCUAGUA)d(TT)-3' 5'-r(UACUAGGCACAUGAAGUAC)d(TT)-3'

D.1.7.3 Zelllinien

HT-1080-Zellen

HT-1080-Zellen wurden von der Firma DSMZ bezogen. Dabei handelt es sich um Fibrosarkom-Zellen, welche 1972 aus der Feinnadel-Biopsie eines 35-jährigen Patienten gewonnen wurden. Der Spender erhielt weder Chemo- noch Strahlentherapie. Die Firma garantiert einen - durch ELISA erhobenen - negativen Befund für Mycoplasmen, Hepatitis-B und -C, Epstein Barr-Virus, Humanes Herpes-Virus 8, HIV, humanes T-lymphotropes Virus I und II und Squirrel Monkey Retrovirus.

SAOS-2-Zellen

SAOS-2 wurden ebenfalls von DSMZ bezogen und stellen Osteosarkomzellen dar, welche 1973 aus einem Tumor einer 11-jährigen Patientin gewonnen wurden. Die Firma garantiert einen - ebenfalls durch ELISA erhobenen - negativen Befund für Mycoplasmen, Hepatitis-B und -C, Epstein Barr-Virus, Humanes Herpes-Virus 8, HIV, humanes T-lymphotropes Virus I und II und Squirrel Monkey Retrovirus.

D.1.8 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken

D.1.8.1 Chemikalien und Materialien

■ Acrylamid : Bisacrylamid (37,1 : 1)	Carl Roth, Karlsruhe
■ Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
■ BCA-Assay	Interchim, Frankreich
■ BioMax	Kodak, USA
■ BioMax Filmkassette	Kodak, USA
■ Brij35	Merck, Darmstadt
■ Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
■ BSA	Sigma, Deisenhofen
■ Cellophan	Carl Roth, Karlsruhe
■ Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
■ DTT	Sigma, Deisenhofen
■ Essigsäure	Merck, Darmstadt

■ Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
■ Gelatine	Merck, Darmstadt
■ Hepes	Sigma, Deisenhofen
■ Methanol	Merck, Darmstadt
■ Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
■ Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
■ Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
■ Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
■ Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Kassel
■ PhastGel Blue R (Coomassie)	Amersham Biosciences, Freiburg
■ Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope	BioRad, München
■ Proteaseninhibitor-Cocktail, Complete-Mini	Roche, Penzberg
■ Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
■ SeeBlue Plus2 Protein-Molekularstandart	Invitrogen, Karlsruhe
■ TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
■ Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
■ Tris-Cl	Sigma, Deisenhofen
■ Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
■ Tween-20	Serva, Heidelberg
■ WesternGlo Detektionsreagenz	R&D Systems, USA
■ Whatman Filterpapier Nr. 1	Whatman/Vetter, Ammerbuch

D.1.8.2 Rekombinante Proteine

■ Murines Wnt3a	R&D Systems, USA
■ Humanes IGFBP-4	R&D Systems, USA

D.2 Methoden

D.2.1 Molekularbiologische Methoden

D.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Prinzip

Um ein Plasmid zu vervielfältigen, benötigt man Bakterien, welche ringförmige DNA durch Transformation aufnehmen und replizieren können. Anschließend muss das Plasmid wieder in Reinform gewonnen werden. Dazu dient die präparative Plasmid-Isolation. Diese beruht auf alkalischer Lyse der Bakterien (Birnboim and Doly 1979) und anschließender Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionen-Austausch-Säule. Die Elution der hochreinen DNA erfolgt in einem anschließenden Schritt mit Endotoxin-freiem Wasser.

Durchführung

Zur Isolation der Plasmide wurde der HiSpeed Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen verwendet. Hierzu wurde am Vortag in einen autoklavierten 100 ml Erlenmeyerkolben 50 ml steriles DYT-Medium gegeben und 50 µl des Selektionsantibiotikums Ampicillin (Konz. 200 µg/ml) zugegeben. Anschließend wurde der entsprechende Bakterien-Klon mit einer sterilen Pipetten-Spitze von der Selektions-Agarplatte gepickt und in den Erlenmeyerkolben überführt. Über Nacht wurde die Kultur bei 37° C und 250 Upm geschüttelt, um genügend Plasmid-tragende Bakterien zu erhalten. Diese wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 15 Minuten bei 4° C und 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand des so erhaltenen Bakterien-Sediment wurde dekantiert, um anschließend die Zellen mit 6 ml RNase-haltigem Puffer resuspendieren zu können. Durch Zugabe des gleichen Volumens eines SDS- und NaOH-haltigen Puffers und nach vorsichtigem Invertieren der Suspension, sowie einer 5minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, erfolgte die Lyse der Bakterien und gleichzeitig eine Denaturierung der chromosomalen DNA. Danach wurde die Lösung mit 6 ml eines gekühlten Kaliumacetat-Puffers neutralisiert, mitsamt des gebildeten weißen Schaums in einen QIAfilter Spritzenzylinder überführt und 10 Minuten inkubiert. Mit Hilfe eines Spritzen-Kolbens wurde das Lysat durch den Filter des Zylinders in ein neues Falcon-Röhrchen gepresst. Nachdem eine QIAGEN-Tip Säule mit 10 ml eines Isopropanol-enthaltenden Puffers äquilibriert worden

war, wurde das gefilterte Lysat aus dem Falcon-Röhrchen auf die Säule überführt. Darauf folgte ein Waschschrift mit 20 ml eines Puffers mittlerer Salzkonzentration und die Elution der DNA mit 5 ml QF-Puffer. Zur erneuten Präzipitation der DNA wurde diese mit 3,5 ml Isopropanol 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit einer Spritze durch ein QIAprecipitator Midi Modul gedrückt. Die Plasmide wurden durch Durchpressen von 70 %igem Etanol durch das Modul gewaschen. Anschließend wurde Luft durch die QIAprecipitator-Einheit gedrückt und dadurch die Membran getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 1 ml Endotoxin-freiem Wasser und die Ausbeute konnte mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden.

D.2.1.2 Analytische Agarosegel-Elektrophorese

Prinzip

Um sicher zu gehen, dass das generierte Plasmid die gewünschte Anzahl an Nukleotiden aufweist und nicht durch andere DNA-Sequenzen verunreinigt ist, wird ein Teil der gewonnenen Plasmid-Lösung in die so genannte Restriktionsanalyse eingesetzt. Dazu wird der Vektor entweder linearisiert oder eine definierte DNA-Sequenz aus dem Vektor geschnitten. Die Enzymaktivität der Restriktionsenzyme wird hierbei in Units angegeben. Ein Unit ist definiert als die Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µg DNA des Phagen Lambda in 1 Stunde unter optimalen Bedingungen quantitativ zu spalten. So berechnet sich die Anzahl der nötigen Units wie folgt:

$$\frac{\text{Anzahl der Nukleotide in } \lambda}{\text{Anzahl der Nukleotide im Vektor / Insert}} \times \frac{\text{Schnittstellen im Vektor / Insert}}{\text{Schnittstellen in } \lambda} = \text{Menge an RE}$$

Anschließend wird eine Agarosegel-Elektrophorese zur Separierung und Identifizierung der DNA-Fragmente durchgeführt. Durch einen Vergleich mit DNA-Fragmenten definierter Größe kann die Länge der Proben-DNA visualisiert und kalkuliert werden.

Durchführung

Die Restriktionsanalyse wurde unter denen der Fa. Roche, Mannheim empfohlenen Pufferbedingungen bei 37° C für mindestens eine Stunde durchgeführt. Zur Analyse wurde 1 µg

DNA eingesetzt und die Anzahl der benötigten Units des Restriktionsenzym nach obiger Formel berechnet. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend in einem 0,8 %igen Agarosegel in einer Horizontalgelapparatur elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose war hierfür in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt) suspendiert und durch aufkochen solubilisiert worden. Um die Nukleinsäuren anschließend im UV-Licht visualisieren zu können, wurde der Agarose-Lösung 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und anschließend in die Apparatur gegossen. In der Zwischenzeit wurden jeweils 20 µl der Proben und des Kontroll-Plasmids mit 2 µl Lade-puffer versehen und nach Erkalten des Gels in dessen Taschen pipettiert. Zusätzlich wurden 6 µl des DNA Molekulargewichtsmarkers *Generuler* 1 kb der Firma MBI Fermentas aufgetragen, um die Größen der Fragmente kontrollieren zu können. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 Volt über 1-3 Stunden. Abschließend wurde die so separierte DNA unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und photographisch dokumentiert.

D.2.1.3 DNA-Sequenzierung

Die automatisierte DNA-Sequenzierung mittels Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden (Sanger, Nicklen et al. 1977) wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

D.2.1.4 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Prinzip

Die Isolierung der Zell-RNA erfolgt mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Das Funktionsprinzip des Kits beruht darauf, dass freigesetzte RNA selektiv an eine spezielle Silika-Gel-Membran einer Isolierungssäule bindet und anschließend von dieser mit RNase-freiem Wasser eluiert werden kann. Die vorherige Freisetzung der RNA aus biologischem Material erfolgt dabei durch Lyse mittels RLT-Puffer und anschließender Homogenisierung durch eine QIAshredder-Säule. Der verwendete RLT-Puffer enthält β-Mercaptoethanol (im Verhältnis 1 : 100) als Reduktionsmittel sowie Guanidin-Thiocyanat, welche eine effektive Inaktivierung der RNasen gewährleisten. Das System ermöglicht RNA-Ausbeuten bis zu 100 µg. Dabei werden allerdings nur Fragmente länger als 200 Basen isoliert, was bedeutet, dass die kürzeren 5.8S rRNAs, 5S rRNAs und tRNAs, welche 15-20% der Total-RNA repräsentieren, nicht im Eluat enthalten sind.

Durchführung

Zu Beginn der RNA-Isolierung erfolgte die Lyse der Zellen. Diese befanden sich in 6-well-Kavitäten-Platten, aus welchen zuerst das Kulturmedium entfernt und anschließend der Inhalt mit 2 ml PBS gewaschen wurde. Nach Verwerfen der Waschlösung, wurde jede Kavität mit 350 µl β -Mercaptoethanol-RLT-Puffer versetzt. Um eine möglichst effiziente Lyse zu erreichen, wurden die Zellen unter Schwenken 5 Minuten mit dem Lyse-Puffer inkubiert. Danach wurde die Suspension in Eppendorf-Gefäße überführt und (mindestens 24 Stunden) bei - 80° C eingefrohren. Nach dem Auftauen wurde die Suspension in eine der mitgelieferten QIAshredder Spin-Säulen überführt und 2 Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert. Daraufhin folgte die Zugabe von 1 Vol (= 350 µl) 70 %igem EtOH sowie eine gründliche Vermischung der beiden Volumina durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Der gesamte Ansatz (700 µl) wurde zentral auf eine der im Kit enthaltenen RNeasy Spin-Säulen überführt und nach erneuter Zentrifugation (15 Sekunden, 8.000 x g) der Durchfluss verworfen, da die RNA auf der Membran der Spin-Säule gebunden war. Durch Zugabe von 700 µl RW1-Puffer auf die RNeasy Mini-Säule und einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 Sekunden bei 8.000 x g wurde die nicht-RNA-haltige Fraktion der Probe entfernt. Anschließend folgte ein zweimaliger Waschschrift durch Zentrifugation mit 500 µl RPE-Puffer (15 bzw. 120 Sekunden, 8.000 x g) und Verwerfen des Durchflusses. Um Ethanolreste im Eluat zu vermeiden und die RNeasy-Membran vollständig zu trocknen, wurde die Säule nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute trocken zentrifugiert. Nachdem die Säule in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt worden war, wurden 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silica-Gel-Membran getropft und durch Zentrifugation (1 Minute bei 8.000 x g) das Eluat gewonnen, welches die isolierte RNA enthielt. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop-Photometers bei einer optischen Dichte von 260 nm bestimmt.

Zum Abgleich des Gerätes (Leerwert) wurde 1 µl RNase-freies Wasser herangezogen. Lag bei der Probe der Quotient von A_{260}/A_{280} nm zwischen 1,8 und 2,2 konnte von einer proteinfreien RNA-Lösung ausgegangen werden.

D.2.1.5 cDNA-Synthese

Prinzip

Das Umschreiben der isolierten RNA in einzelsträngige cDNA erfolgt mit Hilfe des Quantitect Reverse Transcription-Kit (Qiagen, Hilden). Darin werden Oligo-dt- und Zufalls-Primer eingesetzt, welche an die 3'- bzw. auch an andere Regionen der mRNA binden können. Dabei dient die mRNA als Matrize für die cDNA-Synthese. Gleichzeitig wird ein Verdau genomischer DNA vorgenommen. Mit dieser Methode kann bis zu 1 µg Total-RNA in cDNA umgeschrieben werden.

Durchführung

Als Ausgangsmaterial wurden 800 µg RNA verwendet, welche zuvor mit Hilfe des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen isoliert worden war. Da das Endvolumen der gelösten RNA maximal 12 µl betragen durfte, musste es gegebenenfalls durch einen Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer auf das gewünschte Volumen eingengt werden. Zu Beginn der cDNA-Synthese wurde pro Probe ein Master-Mix aus Reverser Transkriptase, Primer und Puffer vorbereitet und gekühlt aufbewahrt. Der Mix setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tab. D-3: Master-Mix für cDNA-Synthese

Komponente	Volumen/Reaktion in µl
Quantitect Reverse Transcriptase	1
Quantiscript RT Puffer 5x	4
RT-Primer Mix	1

Für den anfänglichen 2-minütigen Verdau wurde pro Probe eine definierte Menge mRNA in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 2 µl Wipeout Buffer (7 x) versetzt. Da dieser Ansatz ein Gesamtvolumen von 14 µl erreichen sollte, wurde das dazu fehlende Volumen durch H₂O aufgefüllt. Im PCR-Multicycler wurde dieser Reaktionsansatz für 2 Minuten bei 42° C gestartet. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und nach Zugabe des zuvor hergestellten Master-Mixes die reverse Transkription für 30 Minuten bei 42° C wiederum im

Multicycler durchgeführt. In einem abschließenden Schritt wurde die Reverse Transkriptase bei 95° C für 3 Minuten inaktiviert.

D.2.1.6 Quantitative RT-PCR

Prinzip

Um nachzuweisen, wie viele mRNA-Transkripte eines Gens synthetisiert werden, dient die quantitative RT-PCR. Grundsätzlich handelt es sich bei dieser Art der Polymerasekettenreaktion um ein Verfahren, bei welchem Fluoreszenzfarbstoffe mit der DNA interagieren und die so entstandenen PCR-Produkte mit Hilfe eines Detektors quantifiziert werden können. Man unterscheidet dabei zwischen zwei unterschiedlichen Systemen:

Beim **UPL-System**, welches auf dem TaqMan-Prinzip basiert, wird eine Oligonukleotid-Sonde verwendet, deren 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist. Gleichzeitig trägt das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat). Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Bindet die Sonde allerdings an die Zielsequenz, kann die 5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase die Sonde abbauen, wobei Reporter und Quencher getrennt werden. So wird im Verlauf der PCR mit steigender Produktmenge immer mehr Fluoreszenz freigesetzt. Die Sonde bindet dabei im Amplikon, das durch die beiden Primer bestimmt wird. Nur wenn ein spezifisches PCR-Produkt generiert wird, kann dabei die Sonde abgebaut werden, was die Grundvoraussetzung für eine Quantifizierung darstellt.

Durchführung

Für jede zu analysierende cDNA- und die entsprechenden Standard-Proben wurde ein Mix aus folgenden Komponenten hergestellt:

Tab. D-4: Pipettierschema UPL

Komponente	Volumen/Reaktion in μl
Forward Primer (10 μM Endkonz.)	0,2
Reverse Primer (10 μM Endkonz.)	0,2
Sonde (100 nM Endkonz.)	0,1
TaqMan Master Mix	2,0
H ₂ O	6,5

Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, wurde aus einer der cDNA-Proben eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dafür wurde 1 μl der Probe in 9 μl RNase-freiem Wasser transferiert und gründlich gemischt (1:10 Verdünnung). Mit dieser wurde analog weiter verdünnt, um so eine 1:100- und 1:1000-Verdünnung zu erhalten. Für einen LightCycler-Reaktionsansatz wurde 1 μl cDNA bzw. Standard-Verdünnung mit 9 μl des Mixes zu einem Endvolumen von 10 μl in spezielle LightCycler Kapillaren gefüllt, deren Inhalt schließlich durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 2.400 x g gleichmäßig in die Kapillaren-Röhre überführt wurde. Abschließend wurde jede Kapillare mit einem Plastikstopfen verschlossen und in das dafür vorgesehene Karussell der LightCycler-Apparatur gestellt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 95° C/10 Minuten; (95° C/10 Sekunden, 68° C/10 Sekunden, 72° C/1 Sekunden) x 45 Zyklen. Mit Hilfe der Verdünnungen, mit denen die Proben in Relation gesetzt wurden, konnten imaginäre Kopienzahlen ermittelt werden, die zur relativen Quantifizierung der Transkriptmengen herangezogen wurden. Sie erlaubten so einen Vergleich der Expressionsniveaus einzelner Transkripte in verschiedenen Proben.

Beim **SYBR Green-System** erfolgt die PCR-basierte Produktquantifizierung durch Einlagerung des fluoreszierenden SYBR Green Farbstoffes in doppelsträngiger DNA. Dabei geht die Vermehrung des PCR-Produktes mit einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals einher. Mittels des LightCycler-Systems wird die steigende Menge an spezifisch amplifiziertem Produkt durch die Zunahme der Fluoreszenz quantitativ erfasst. Durch gleichzeitige Bestimmung mehrerer Proben unterschiedlicher Verdünnungsstufen mit genau definierter Kopienzahl kann eine Standardkurve generiert werden, anhand derer auf die Kopienzahl in den analysierten Proben zurückgeschlossen werden kann.

Durchführung

Für jede zu analysierende cDNA- und die Standard-Proben wurde ein Mix aus folgenden Komponenten hergestellt:

Tab. D-5: Pipettierschema für den SYBR-Green-Ansatz

Komponente	Volumen/Reaktion in μl
H ₂ O	3
Primer Set	1
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (inklusive DNA-Polymerase, PCR-Puffer + dNTPs)	1

Zunächst wurde die im Kit enthaltene Standard-Probe im Verhältnis 1:20, 1:200 und 1:2000 im ebenfalls mitgelieferten Standard-Stabilizer verdünnt. Zum Befüllen der LightCycler-Kapillaren wurden für jede Probe 4 μl H₂O vorgelegt und mit 5 μl des PCR-Ansatzes und 1 μl der cDNA-Probe zu 10 μl ergänzt. Jeder Standard setzte sich aus 5 μl Standard-Verdünnung und jeweils 5 μl PCR-Ansatz zusammen. H₂O wurde als Negativkontrolle zusätzlich mitgeführt. Mit den so befüllten Kapillaren wurde analog dem UPL-System verfahren. Die PCR-Bedingungen richteten sich nach den Angaben des Primerset-Herstellers Search-LC (www.search-LC.de). Demnach erfolgte eine Anfangsdenaturierung bei 95° C für 10 Minuten, wobei 35 Zyklen mit 95° C/10 Sekunden, 68° C/10 Sekunden und 72° C/16 Sekunden mit Fluoreszenzverstärkung 5 folgten.

Abschließend wurde durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur eine Schmelzkurvenanalyse mit den Parametern 95° C → 58° C/10 Sekunden → dT/dt 0,1° C/Sek. durchgeführt,

die es erlaubt, die Spezifität der PCR zu überprüfen (Ausschluss von Primerdimeren und unspezifischen Produkten).

D.2.2 Mikrobiologische Methoden

Die meisten in der vorliegenden Arbeit verwendeten mikrobiologischen Methoden wurden nach Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook and Russel, 2001). Abweichende Methoden werden im Einzelnen aufgeführt.

D.2.2.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme

Zunächst wurden pro Transformation ein 50 µl Aliquot, bei - 80° C gelagerter, chemisch kompetenter *E. coli* für 10 Minuten auf Eis gelagert, um die Bakterien schonend aufzutauen. Anschließend wurde die zu transformierende Plasmid-Lösung in einer Konzentration von maximal 100 ng/µl zu den Bakterien pipettiert. Dieser Transformationsansatz wurde für 30 weitere Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 45sekündiger Hitzeschock bei 42° C, wonach die Probe wieder 5 Minuten auf Eis gestellt wurde. Damit sich die Bakterien vom Membran-destabilisierenden Hitzeschock regenerieren konnten, wurde der Ansatz mit 250 µl des nährstoffreichen SOC-Mediums (5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM D(+)-Glukose) versehen und diese Suspension bei 37° C und 220 upm für 60 Minuten geschüttelt. Die so behandelten *E. coli* konnten nun auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37° C inkubiert werden.

D.2.2.2 Kultivierung und Selektion transformierter *E. coli*-Stämme

Wachstumsmedium

Zur Kultivierung der *E. coli*-Stämme wurde DYT-Medium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) mit einem pH Wert von 7,5 verwendet. Dieses wurde für 20 Minuten bei 121° C und 1 x 10⁵ Pa Überdruck sterilisiert und nach anschließendem Abkühlen gegebenenfalls mit Hitze-labilen, sterilfiltrierten Lösungen (z.B. Antibiotika) versetzt. Zur Herstellung von Kultivierungsplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt.

D.2.2.3 Herstellung und Lagerung der *E. coli*-Stämme

Um die *E. coli*-Klone über längere Zeiträume zu lagern, wurde die einzelnen Kolonien, welche sich nach der Transformation der Bakterien gebildet hatten, mit einer sterilen Pipettenspitze von den Selektionsagar-Platten gepickt und über Nacht in DYT-Medium kultiviert. Tags darauf wurden 3 ml der Bakterien-Suspension abgenommen, mit 500 ml sterilem Glycerin (100 %) versetzt und in ein Kryo-Gefäß gefüllt. Dieses wurde anschließend nummeriert und bei - 80° C in die laborinterne Bakterien-Stammsammlung aufgenommen, wobei der Genotyp der Bakterien, das jeweilig transformierten Plasmid und die entsprechende Antibiotikumresistenz festgehalten wurden.

Für eine kürzere Lagerung (bis ca. 6 Wochen) wurden die *E. coli* auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert, über Nacht bei 37° C bebrütet und danach bei 4° C aufbewahrt.

D.2.3 Zellbiologische Methoden

D.2.3.1 Zellen Auftauen und Einfrieren

Zum Auftauen der Zellen wurde das gewünschte Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, bei Raumtemperatur aufgetaut und sein Inhalt in ein 10 ml Falcon-Röhrchen überführt. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 800 x g konnten die Zellen von ihrem DMSO-haltigen Einfriermedium getrennt und dieser Überstand abgenommen werden. Das entstandene Zell-Sediment wurde mit 10 ml frischem Nährmedium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche (T75) überführt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden bei Arbeitsbeginn die für die jeweiligen Zellen notwendigen Einfriermedien hergestellt (Tab. D-7). Ansonsten verlief die Kryokonservierung bei beiden Zell-Populationen nach dem gleichen Schema: zunächst wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA abgelöst und gezählt (siehe Kapitel D.2.3.4). Anschließend wurden die gezählten Zellen vom Kulturmedium abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands, wurden die Zellen so im entsprechenden Einfriermedium resuspendiert, dass sich jeweils 1×10^6 Zellen bei SAOS-2 bzw. $2-3 \times 10^6$ Zellen bei HT1080 in 1 ml Einfriermedium befanden. Die Zellsuspensionen wurden als 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen aufgeteilt. Diese Röhrchen wurden zunächst

zwei Stunden bei -20° C gelagert. Danach wurde das Gefriergut für weitere 12 - 16 Stunden bei -80° C aufbewahrt und abschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Tab. D-6: Einfriermedien für SAOS-2 und HT1080 Zelllinien

	Medium	Medium (%)	FBS (%)	DMSO (%)
SAOS-2	Mc Coys	70	20	10
HT 1080	DMEM	70	20	10

D.2.3.2 Kultivierung von SAOS-2 bzw. HT1080

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) bei 37° C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Die Zellen befanden sich dabei in 25 bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen und wurden mit 5 bzw. 10 ml Medium kultiviert. In 2-3 täglichen Abständen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem zuerst das verbrauchte Medium abgesaugt wurde. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 3 bzw. 5 ml einer Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) ohne Mg²⁺ - und Ca²⁺ -Ionen. Abschließend wurden die Zellen wieder mit 5 bzw. 10 ml des dem Zelltyp entsprechenden Mediums versorgt (Tab. D-7).

Tab. D-7: Kultivierungsmedien für die SAOS-2 und HT1080 Zelllinien

Zelltyp	Medium	Zusätze
SAOS-2	McCoys	30 % FBS, 1 % Pen/Strep
HT1080	DMEM	10 % FBS, 1 % Pen/Strep

D.2.3.3 Splitten konfluenter Zellen

Bei einer Konfluenz von ca. 95-100 % konnten die Zellen gesplittet werden. Dafür wurde wiederum das verbrauchte Medium aus den Kulturflaschen entfernt und der verbleibende Zellrasen mit 3 bzw. 5 ml PBS gewaschen. Dieser Waschschriff wurde durchgeführt, um Serum-Rückstände des alten Mediums zu entfernen, welche ansonsten eine Inhibition des Trypsins bewirkt hätten. Nach Entfernung der PBS-Lösung wurden 2 bzw. 3 ml Trypsin/EDTA-

Lösung auf die Zellen pipettiert. Durch Einwirkenlassen für 5 (HT1080) bzw. 10 (SAOS-2) Minuten wurde meist eine vollständige Ablösung der Zellen vom Kulturflaschenboden erreicht. Besonders adhärente Zellen konnten durch leichtes Anstoßen des Flaschenbodens oder durch Zugabe von 1-2 Tropfen 10fach konzentrierten Trypsins von der Unterlage entfernt werden.

Anschließend wurde der Flascheninhalt mit Medium auf 5 bzw. 10 ml ergänzt und diese Suspension in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 800 x g wurde der trypsinhaltige Überstand abgenommen, die Zellen im jeweiligen Kultivierungsmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturkavität ausgesät.

D.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Um mit definierten bzw. vergleichbaren Zellzahlen arbeiten zu können, wurde hierzu eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Dazu wurde ein Neubauer Zählkammer verwendet, welche zu Versuchsbeginn angefeuchtet und mit einem Deckglas belegt wurde. Sobald sich Newtonsche-Ringe gebildet hatten, konnten ca. 15 µl Zellsuspension in den kapillaren Spalt zwischen Zählkammer und Deckglas pipettiert werden. Die Anzahl der in den vier Quadranten enthaltenen Zellen wurde im Mikroskop ermittelt und die Zellzahl/ml wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{n_{\text{Zellen}_{\text{total}}}}{n_{\text{Quadrate}}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

D.2.3.5 Transfektion

Allgemeines Prinzip

Unter Transfektion versteht man im Allgemeinen das Einbringen von fremder genetischer Information in eukaryotische Zellen. Dabei wird nicht wie bei der Transduktion auf Viren als Vehikel für die Transgene zurückgegriffen, sondern mit Hilfe physikalischer und biochemischer Methoden versucht, Nukleinsäure-Fragmente in die Zelle einzuschleusen. In der vorliegenden Arbeit wurde speziell die liposomale Transfektion durchgeführt, bei der man sich die Wechselwirkung der anionischen Nukleinsäuren mit dem kationischen liposomalen Transfektionsreagenz (Lipofektamine 2000) zu Nutze macht. Bei dieser Art von Transfektionsreagentien lagern sich die hydrophoben Anteile im wässrigen Milieu spontan

aneinander, da sie bestrebt sind, sich von der Lösung weg zu orientieren. Dabei bilden sich Lipid-Doppelschichten ähnlich der Bilayer-Struktur von Zellmembranen.

Diese können sich Micellen-ähnlich zu dreidimensionalen Kugeln formieren. Inkubiert man liposomale Transfektionsreagentien zusammen mit DNA-Molekülen, komplexiert das Reagenz zusammen mit der DNA. Der so entstandene Liposmen-DNA-Komplex wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Transfektion mit siRNA

Prinzip der RNA-Interferenz

Unter natürlichen Bedingungen versteht man unter RNA-Interferenz einen Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der die Expression einzelner Gene beeinflusst. An diesen regulatorischen Mechanismen sind ca. 21-23 nt lange einzelsträngige RNA-Moleküle beteiligt, die in der Regel zu einem Abbau der entsprechenden Ziel-mRNA führen. Dies spielt sowohl bei Genregulationsprozessen als auch bei der Abwehr von Viren (z.B. bei Pflanzen) eine bedeutende Rolle. Für die Entdeckung des Mechanismus der RNA-Interferenz erhielten die beiden US-Wissenschaftler Andrew Z. Fire (Stanford Universität) und Craig C. Mellow (University of Massachusetts) 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Im Labor macht man sich den Mechanismus der RNA-Interferenz mittels siRNAs (*small interfering ribonucleic acids*) zunutze. Bringt man derartige siRNAs mittels Transfektion in die Zelle ein, führt dies zum Abbau von spezifischen mRNA-Gentranskripten und nachfolgend zu einer Abnahme des entsprechenden Genproduktes, was auch als Knockdown bezeichnet wird.

Durchführung

Der Knockdown von Fzd8 in HT1080-Zellen wurde mittels einer Kotransfektion von zwei an unterschiedliche Regionen der Fzd8-mRNA bindende siRNAs durchgeführt. Da die Transfektion hauptsächlich in 6-Kavitäten-Zellkulturplatten erfolgte, sind die folgenden Angaben auf dieses Format bezogen.

Am Tag vor der geplanten Transfektion erfolgte die Aussaat von 100.000 Zellen pro Kavität in der Zellkulturplatte, so dass die Zellen am Transfektionstag einen 50-60 %igen Konfluenzgrad

aufwiesen. Vor der Transfektion wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend jede Kavität wieder mit 1,5 ml frischen Mediums befüllt. Anschließend wurden unter der Laminar Flow drei sterile 5 ml Polystyrolröhrchen vorbereitet. Für jede mit siRNA zu transfizierende Kavität wurden in das erste Röhrchen 250 µl Serum-freies DMEM und anschließend 4 µl Fzd8-siRNA (#1) und 4 µl Fzd8-siRNA (#2) gegeben, was einer siRNA-Gesamtkonzentration von 80 nM entsprach. Das zweite Röhrchen war für die Negativ-Kontroll-siRNA bestimmt und wurde entsprechend der Anzahl an Negativ-Kontrollen pro Kavität mit 250 µl Serum-freiem DMEM und 8 µl nc-siRNA befüllt (Gesamtkonzentration von 80 nM). In das verbliebene Transfektionsröhrchen wurde für jede Kavität, unabhängig davon ob siRNA oder nc-siRNA transfiziert wurde, 250 µl Serum-freies DMEM und 8 µl des Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 pipettiert. Dabei betrug das Verhältnis von Transfektionsreagenz zur eingebrachten DNA-Menge 1:1. Der DMEM-Lipofectamine 2000-Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu gleichen Anteilen auf die siRNA-Ansätze verteilt. Hierauf erfolgte eine weitere 20minütige Inkubation der beiden Lösungen, was die Bildung der so genannten Lipoplexe (Komplex aus Lipofectamine 2000 und Nukleinsäure) ermöglichte. Danach folgte die tropfenweise Zugabe von 500 µl Lipofectamine 2000/Nukleinsäure-Lösung auf die Zellen, wodurch sich ein Kultivierungsendvolumen von 2 ml pro Kavität ergab. Nach einer 6-stündigen Inkubation der so transfizierten Zellen unter Standard-Kulturbedingungen erfolgte die Abnahme des Transfektionansatzes und der Ersatz durch frisches Kulturmedium.

In weiteren Versuchen erfolgte zudem ein Knockdown der Fzd-Rezeptoren 1-7. Das Vorgehen entsprach dem Knockdown von Fzd8, allerdings mit dem Unterschied, dass es sich hierbei nicht um Kotransfektionen sondern um eine Einzeltransfektion handelte. Dementsprechend wurden pro transfizierter Kavität 8 µl einer für den jeweiligen Rezeptor spezifischen siRNA (80 nM) eingesetzt. Der Einsatz von Lipofectamine 2000 und der nc-siRNA erfolgte wie bereits oben beschrieben.

Transfektion mit Plasmid-DNA

Prinzip der Transfektion mit Plasmid-DNA

Auch durch eine Transfektion mit Plasmid-DNA kann ein Knockdown nach dem Prinzip der RNA-Interferenz erreicht werden. Dabei kann die Plasmid-DNA entweder nur transient oder

aber auch stabil eingebracht werden. Im letzten Fall geht das mit einer Integration des Plasmids in das Genom der Zelle einher, was eine konstante Expression des Transgens über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten bewirkt. Zur Durchführung dieser so genannten stabilen Transfektion ist auf dem transfizierten Vektoren eine Antibiotikumresistenz gegen Neomycin (G418) kodiert, die den stabil modifizierten Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber nicht-transfizierten oder transient-transfizierten Zellen verleiht.

Durchführung

Die Transfektion mit Plasmid-DNA unterschied sich nicht wesentlich im Vergleich zur siRNA-Transfektion. Allein in der Menge der eingesetzten Reagentien gab es Abweichungen. So wurde pro transfizierter 6-well Kavität 1 µg DNA eingesetzt. Das Verhältnis an Lipofectamine 2000 zur eingebrachten DNA-Menge betrug 1,5 : 1. Wie oben beschrieben, wurden Transfektionsansätze hergestellt, welche tropfenweise auf die tags zuvor ausgesäten Zellen pipettiert und anschließend inkubiert wurden. Wenn das Einbringen der DNA mit dem Ziel der stabilen Integration in das Genom erfolgen sollte, wurden die Zellen am 2. bzw. 3. Tag nach der Transfektion mit dem Standard-Medium weiterkultiviert, welches allerdings zusätzlich 1 mg/ml des Antibiotikums Neomycin enthielt. Diese Antibiotikum-Selektion wurde bei den Tumorzellen während der gesamten Kultivierungsdauer nach der Transfektion fortgesetzt.

D.2.3.6 Picken einzelner Zell-Klone mit Klonierungszyklindern

Prinzip

Durch das Picken einzelner stabil transfizierter Zellen können homogene Populationen aus nur einem einzelnen Zell-Klon generiert werden. Diese so genannte klonale Expansion ist oft von Vorteil, da man damit einen einheitlichen Zellklon als Grundlage für weitere Versuche generieren kann. Aufgrund der Tatsache, dass die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzellen ein adhärentes Wachstum aufweisen, wurden zum selektiven Ablösen einzelner Klone die so genannten Klonierungszyklinder als Hilfsmittel eingesetzt.

Durchführung

Nach erfolgreicher Selektion mit G418 wurden die verbliebenen stabil transfizierten Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung von dem Zellkulturgefäß gelöst und in Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm subkultiviert. Daraus resultierte eine äußerst geringe Zelldichte von ca. 1 Zelle/cm², so dass die Zellen in einem ausreichend großen Abstand voneinander Kolonien bilden konnten. Eine mögliche Expansion der Zellen wurde jeden Tag mikroskopisch kontrolliert. War diese eingetreten, wurde der Klon unter dem Mikroskop auf der Unterseite der Zellkulturplatte mit einem Filzstiftpunkt markiert und anschließend der Inhalt der Platte mehrmals mit PBS gewaschen, um das Ablösen semiadhärenter Zellen zu erreichen. Nach Entfernen des PBS wurde mit einer sterilen Pinzette auf jede Markierung ein Cloning Tube aufgesetzt, dieser mit 50 µl Trypsin/EDTA gefüllt und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Grad des Zellablösens unter dem Mikroskop kontrolliert. Falls sich die Zellen, welche selektiv in den Tubes behandelt worden waren, noch nicht abgelöst hatten, wurde vorsichtig der Inhalt des Röhrchens auf- und abpipettiert, um durch Scherkräfte eine Mobilisierung der Zellen zu erreichen. Die erhaltene 50 µl Zellsuspension wurde nun aus dem Röhrchen abpipettiert und in eine mit Kultivierungsmedium gefüllte 12- bzw. 24-Kavitäten-Zellkulturplatte überführt. 24 Stunden später erfolgte der erste Mediumwechsel.

D.2.3.7 Zellinvasionsstudien

Prinzip

Ein zentrales Kriterium für die Malignität von Tumorzellen ist deren Fähigkeit den eigenen Zellverband zu verlassen und durch Überwinden der Basalmembran in umliegendes Gewebe oder in die Blutbahn einzudringen. Der entscheidende Moment dieses Vorganges ist der Abbau der Basalmembran, welcher bei den Zellen das Vorhandensein proteolytischer Enzyme voraussetzt. Eine Möglichkeit dieses Invasionsvermögens *in vitro* zu untersuchen, stellt der sog. Transwell-Assay dar. Dabei handelt es sich um eine 24-Kavitäten Platte in deren Vertiefungen bis zu 12 Einsätze eingebracht werden können, auf die eine Polycarbonat-Membran mit 5 bzw. 8 µm Porengröße aufgebracht ist. Diese wird mit humaner extrazellulärer Matrix (hECM) beschichtet, welche als Basalmembran-Äquivalent von den Zellen überwunden werden muss. Außerdem entstehen so zwei räumlich voneinander abgegrenzte Kompartimente, über die mittels unterschiedlicher Medien ein Chemoattractant-Konzentrationsgradient auf-

gebaut werden kann, welcher für invasive Prozesse unerlässlich ist. Bei beiden Tumorzelllinien wurde der Invasionsassay unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Lediglich die Porenweite der Trennmembran betrug bei SAOS-2-Zellen 8 μm und bei den kleineren HT1080-Zellen 5 μm .

Durchführung

Am Tag vor dem Einsetzen der Zellen in das obere Kompartiment wurde die Membran mit 10 μg hECM (BD Biosciences, USA) beschichtet. Dazu wurde pro Kavität die entsprechende Menge an Matrix-Suspension in 200 μl Serum-freiem RPMI-Medium gelöst und in das obere Kompartiment pipettiert, so dass dort ein gleichmäßiger hECM-Film entstand. Dieser wurde unter sterilen Bedingungen über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Flüssigkeit verdampfte und sich eine gleichmäßige Beschichtung ergab. Am Versuchstag wurde die getrocknete Membran für zwei Stunden mit 200 μl DMEM-Nutridoma (1 %) rehydriert. Nach Ablauf dieser Zeit konnte mit dem Befüllen der Transwell-Kavität begonnen werden. Dafür wurden im unteren Kompartiment 600 μl DMEM-Nutridoma vorgelegt, welches 10, 15 bzw. 20 % Humanserum enthielt. Diese verschiedenen Serumkonzentrationen sollten bei der Invasion der Zellen aus dem oberen in das untere Kompartiment zur Optimierung der Chemoattractant-Parameter dienen. Für den Invasionsversuch wurden SAOS-2 und HT1080-Zellen verwendet, welche zuvor stabil mit dem Vektor pEGFP-N3 transfiziert worden waren. Derartig modifizierte Zellen hatten den Vorteil, dass sie unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 450-490 nm grün leuchteten, und so das Invasionsvermögen der Zellen in jedem Stadium verfolgt werden konnte, ohne dass der Ansatz für Zellfärbungen abgebrochen werden musste.

Die Zellen, welche für den Invasionsversuch bestimmt waren, wurden zunächst unter standardisierten Versuchsbedingungen kultiviert und gegebenenfalls transfiziert. Danach wurden sie vom Kultivierungsgefäß abgelöst und so in Kultivierungsmedium resuspendiert, dass pro Vertiefung 50.000 Zellen mit 200 μl Kulturmedium in die obere Kavität gefüllt werden konnten. Der Invasionsversuch wurde gestartet, indem jedes Zell-Insert in eine mit Humanserum gefüllte untere Kavität gestellt wurde. Die Inkubation der Transwellplatten erfolgte im Brutschrank unter Standardbedingungen. So konnten in verschiedenen Zeitabständen die Zellen, welche den Matrix-Film und die Membran überwunden hatten im Fluoreszenzmikroskop gezählt und somit die Invasionsraten bestimmt werden.

D.2.3.8 Proliferationsstudien

Prinzip

Die Untersuchung der Proliferation von eukaryotischen Zellen kann mittels CyQuant-Assay-Proliferation Kit der Firma Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgen. Seine Funktion beruht auf der Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffes CyQuant, welcher mit Nukleinsäuren interkaliert. Um diese Interaktion zu ermöglichen werden die Zellen lysiert und anschließend mit dem Farbstoff inkubiert. Zur Bestimmung der Zellzahlen, wird die Fluoreszenz der untersuchten Zellentität mit der Fluoreszenz eines definierten Zellstandards verglichen, welcher ebenfalls mit dem Farbstoff inkubiert wird.

Durchführung

Um zu verfolgen, inwieweit der Rezeptor Fzd8 das Proliferationsvermögen von HT1080 Zellen beeinflusst, wurde vor der Durchführung des eigentlichen Proliferations-Assays ein Knockdown des Fzd8-Rezeptors mittels RNA-Interferenz durchgeführt. Dabei wurden in die Kavitäten der 6-well Platten jeweils 30.000 Zellen ausgesät. Die Transfektion mit den entsprechenden siRNAs erfolgte wie in Kap. D.2.3.5 beschrieben. Nach den entsprechenden Zeitintervallen wurden die Kavitäten zunächst mit PBS gewaschen. Nachdem die Waschlösung von der Zellschicht entfernt worden war, wurden die Platten mit dem Zellrasen bei -80° C für mindestens 24 Stunden eingefroren. Für den Standard wurden untransfizierte Zellen trypsiniert und die Zellsuspension so aliquotiert, dass 100.000 Zellen/ml in Eppendorf-Gefäße gefüllt werden konnten. Anschließend wurde der Überstand abzentrifugiert, die Zellen mit PBS gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt das Zellsediment im Eppendorf-Gefäß ohne Überstand ebenfalls bei - 80° C eingefroren. Am Versuchstag wurden die Platten sowie ein Zell-Aliquod zur Generierung einer Standardkurve wieder aufgetaut. In jede Zellkavität wurden 400 µl eines im Kit enthaltenen Lysepuffers pipettiert und 20 Minuten unter Schwenken bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde für den Zellstandard das Sediment mit Lysepuffer vermischt, so dass jeweils eine Verdünnung 1 : 1000 und 1 : 100.000 entstand. Aus diesen wurden folgende Standards hergestellt:

Tab. D-8: Verdünnungsreihen für den Zellstandard im CyQuant-Assay

Zellzahl	Verdünnung 1:1000 (µl)	Lysepuffer ad 100 µl
50.000	50	50
10.000	10	90
5.000	5	95

Zellzahl	Verdünnung 1:100.000 (µl)	Lysepuffer ad 100 µl
1.000	100	
500	50	50
100	10	90
50	5	95

Anschließend wurde der Standard und jeweils 100 µl einer jeden Probe in die Vertiefung einer schwarzen 96-Kavitäten-Platte pipettiert. Unmittelbar vor der Messung wurde der CyQuant-Farbstoff in Lysepuffer gelöst und in einer Verdünnung von 1 : 200 zu jedem Ansatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2-5 Minuten wurde die Emission bei 520 nm gemessen, wobei die Messwerte jeweils prozentual in Relation zur entsprechenden Kontrolle dargestellt wurden.

D.2.3.9 Gaussia-Luciferase-Aktivitätsmuster in stabil transfizierten HT1080-Zellen

Prinzip

Durch stabile Transfektion des Vektors pN3-BAR-GLuc in HT1080 werden Zellpopulationen generiert, welche die Fähigkeit haben als Reporter für Wnt/ β -Catenin-regulierte Vorgänge in der Zelle zu fungieren. Mit Hilfe des Vektors werden zusätzliche Tcf/Lef-Bindungsstellen für β -Catenin in das Genom der Zelle integriert. Diese führen nach Translokation von β -Catenin in den Zellkern zur Bildung von Komplexen zwischen den Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef und β -Catenin. Diese Komplexbildung löst die Expression des Reportergens Gaussia Luciferase aus, welche dann nach Sekretion im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann. Somit können mit Hilfe dieses Systems die subzelluläre Lokalisation, und damit einhergehend die transkriptionell aktiven Faktoren von β -Catenin quantifiziert werden.

Durchführung

Testung der Reportereigenschaften einzelner Zellklone mit Lithiumchlorid

Nach erfolgter Transfektion, Selektion und klonaler Expansion lagen mehrere Populationen stabil transfizierter Zellen vor, welche zuerst auf ihrer Reportereigenschaften getestet werden mussten. Dies erfolgte durch Stimulation mit Lithiumchlorid (LiCl). LiCl hat die Eigenschaft das Protein GSK3 β zu binden und damit funktionslos zu machen. Da GSK3 β normalerweise mit zur Degradation von β -Catenin beiträgt, steigt nach erfolgter LiCl-Stimulation die β -Catenin-Konzentration in der Zelle an. β -Catenin kann in den Zellkern übertreten und in funktionellen Reporterzellen zu einer vermehrten Expression der Gaussia Luciferase führen.

Nachdem die Zellen stabil transfiziert und einzelne Klone mit Cloning-Tubes selektioniert und expandiert waren, wurden die verschiedenen Reporterzell-Populationen in die Vertiefungen von 12-Kavitäten-Platten ausgesät. Dies erfolgte derart, dass sich in jeder Vertiefung 50.000 Zellen befanden und jeder Klon im Triplet stimuliert und ebenfalls im Triplet als Negativ-Kontrolle nicht stimuliert werden konnte. Gleichzeitig wurde ein Zellkulturmedium verwendet, welches nur 2% FBS enthielt. Diese sollte sicherstellen, dass im Versuchsverlauf durch die Inhaltsstoffe des FBS möglichst wenige Interaktionen mit LiCl oder anderen aktiven Bestandteilen der Stimulation erfolgen konnten. Zur eigentlichen Stimulation wurde am Tag darauf in den inzwischen adhärennten Zellen, das alte Kulturmedium entfernt und durch 600 μ l neuen Mediums ersetzt. Zusätzlich wurde in jede Kavität (ausschließlich der negativ Kontrollen) 3 μ l einer LiCl-Verdünnung (1:10) pipettiert, so dass sich in jeder Kavität eine LiCl-Konzentration von 4 mmol ergab. An Tag 1 bis Tag 5 nach Stimulation erfolgte die Überstand-Abnahme (50 μ l) und der Transfer in die Vertiefung einer schwarzen 96-Kavitäten-Platte. Unmittelbar vor der Messung im Luminometer bei 740 nm erfolgte die Zugabe des 100-fach konzentrierten Gaussia-Luciferase Substrates des Gaussia-Luciferase-Kits der Firma NEB. Dieses war zuvor im mitgelieferten Puffer zu einem Endvolumen von 50 μ l pro Probe gelöst worden.

Versuchsdurchführung mit den Reporterzellen

Alle mit den Reporterzellen durchgeführten Versuche erfolgten in Kulturmedium, welches 2% FBS, 1%Pen/Strep und 1000 μ l/ml Neomycin enthielt. Die Zellen wurden für jeden Ver-

such am Vortag ausgesät und am Tag der Transfektion bzw. Stimulation mit neuem Medium versorgt. Die Zellzahlen und Füllvolumina der einzelnen Versuchgefäße variierten und sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Tab. D-9: Übersicht über die Zellzahlen und Füllvolumina in Versuchen mit pN3-BAR-Gluc

Kavitäten pro Platte	Zellzahl	Füllvolumen während des Versuchs in μl
6-well	100.000	1000/1200
12-well	50.000	600/800
24-well	20.000	400/500

Die eigentliche Transfektion bzw. Stimulation wurde wie in den einzelnen Kapiteln beschrieben durchgeführt. Die Überstandabnahme erfolgte nach 6 Stunden bis 8 Tagen und betrug jeweils 50 μl . Bei der Messung der Gaussia Luciferase wurde wie im Stimulationsversuch LiCl eingesetzt.

D.2.4 Datenanalyse

Die statistische Signifikanz wurde ermittelt, indem die Mittelwerte \pm Standardabweichung zweier Triplikate mittels T-Test verglichen wurden. Hierfür wurde Microsoft Office XP Excel verwendet. Als statistisch signifikant wurden P-Werte angesehen, die kleiner als 0,05 (*), 0,01 (**) bzw. 0,001 (***) waren, womit die Unterschiede mit einer Fehlerquote von 5%, 1% bzw. 0,1% berücksichtigt wurden.

E Ergebnisse

E.1 Basales Fzd-Expressionsmuster

E.1.1 Basales Fzd-Expressionsmuster in SAOS-2 Zellen

Um zu überprüfen, welche der 10 Frizzled-Rezeptoren in SAOS-2 Zellen unter Standardzellkulturbedingungen exprimiert werden, wurde deren Expressionsmuster auf mRNA-Ebene analysiert. Zu diesem Zweck wurde aus nicht-stimulierten SAOS-2 Zellen mRNA isoliert, daraus cDNA synthetisiert und im Anschluss daran wurden mittels qRT-PCR die Expressionslevel der einzelnen Frizzled-Rezeptoren quantifiziert.

Sämtliche Quantifizierungen wurden jeweils auf das Expressionslevel von Fzd7 normiert, wobei dieses als 100 % festgelegt wurde. Diese Normierungsstrategie lag darin begründet, dass Fzd7 zum einen in den untersuchten Zelllinien in ausreichendem Maße exprimiert wird und zum anderen ein bekanntes Wnt-Zielgen darstellt (Willert, Epping et al. 2002).

Für die Messung der einzelnen Fzd-Rezeptoren wurde das UPL-Sonden-System, das auf dem sog. TaqMan-Prinzip beruht, verwendet. Die Anzahl der Rezeptor-RNA-Transkripte wurde nicht absolut quantifiziert, die Ergebnisse wurden vielmehr anhand der jeweiligen crossing points mittels der so genannten $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet (Winer, Jung et al. 1999; Livak and Schmittgen 2001). Dieser Ansatz ermöglichte eine relative Quantifizierung der Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Expression der Fzd-Rezeptoren 1-8 quantifiziert, da Fzd9 und 10 ein äußerst geringes Expressionsniveau aufwiesen, das am Rande der Nachweisgrenze lag.

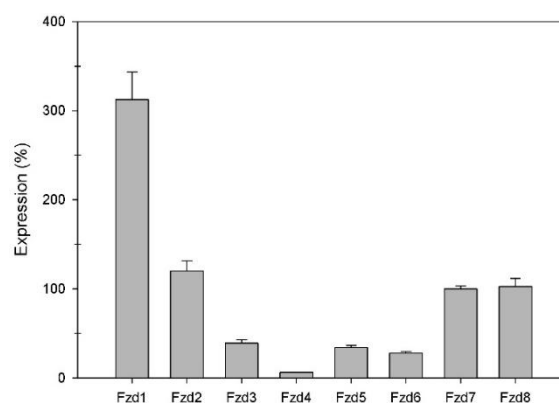


Abb. E-1: Vergleich der basalen Expression von Frizzled 1-8 in SAOS-2 Zellen auf mRNA-Ebene
Die einzelnen Messergebnisse wurden jeweils in das Verhältnis zum Expressionsniveau von Fzd7 (100 %) gesetzt.

Die Experimente zeigten, dass in SAOS-2 Zellen grundsätzlich die Frizzled-Rezeptoren 1-8 exprimiert werden. Dabei wies Fzd1 eine ca. dreifach so hohe Expression wie Fzd7 auf, während die Expression von Fzd2 und 8 in etwa der gleichen Größenordnung wie die von Fzd7 lag. Fzd3, 5 und 6 zeigten im Vergleich zu Fzd7 mit 39, 33 und 28 % hingegen deutlich niedrigere Expressionsniveaus. Fzd4 wurde in SAOS-2 Zellen in sehr geringen Mengen exprimiert (6 % im Vergleich zu Fzd7).

E.1.2 Basales Fzd-Expressionsmuster in HT1080 Zellen

Nachdem sich HT1080 Zellen im Vergleich zu SAOS-2 Zellen als deutlich invasiver gezeigt hatten, wurde auch für diese Zelllinie die basale Expression der Frizzled-Rezeptoren 1-8 mittels qRT-PCR evaluiert. Dabei wurde wie bei SAOS-2 das UPL-Sonden-System verwendet und die Ergebnisse anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode vergleichend dargestellt.

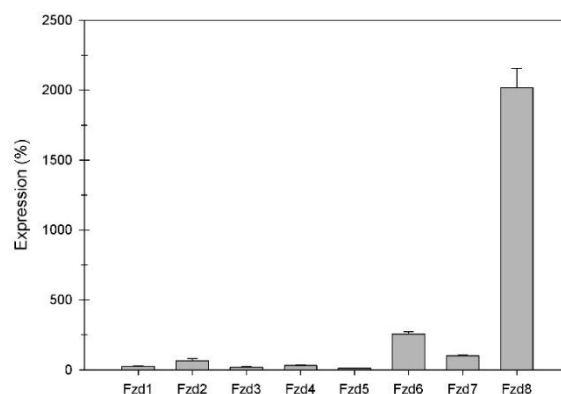


Abb. E-2: Vergleich der basalen Expression von Frizzled 1-8 in HT1080 Zellen auf mRNA-Ebene
Die einzelnen Fzd-Expressionslevel wurden jeweils in das Verhältnis zum Expressionsniveau von Fzd7 (100 %) gesetzt.

Die Versuche zeigten, dass auch in HT1080 Zellen grundsätzlich die Frizzled-Rezeptoren 1-8 exprimiert werden. Besonders auffällig war, dass Fzd8 im Vergleich zu Fzd7 eine ca. 20fach höhere Expressionsrate aufwies. Die zweithöchste Expression wies Fzd6 auf, ca. 2,5-fach im Vergleich zu Fzd7. Dagegen zeigten Fzd1, 2, 3, 4 und 5 deutlich niedrigere Expressionslevel, wobei letzterer nur etwa 10 % des Expressionsniveaus von Fzd7 aufwies.

E.2 Stabile Transfektion von SAOS-2 Zellen mit pEGFP-N3

Um das Invasionsverhalten von SAOS-2 Zellen fluoreszenzmikroskopisch über verschiedene Zeitintervalle quantifizieren zu können, wurden diese zunächst mit dem Vektor pEGFP-N3 transfiziert, der für das *enhanced green fluorescent protein* codiert. Unter Verwendung von 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Plasmid-DNA und der 2fachen Menge von Lipofactamine 2000 wurden Transfektionsraten von ca. 90 % erreicht. Nach anschließender Selektion mit G418 und klonaler Expansion mittels Klonierungszylindern konnte eine homogene Population von EGFP-exprimierenden Zellen erreicht werden (Abb. E-3).

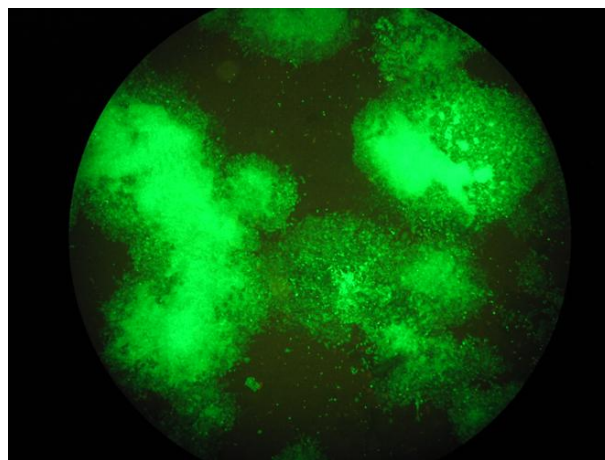


Abb. E-3: Verschiedene SAOS-2 Zell-Klone nach stabiler Transfektion mit EGFP-N3.

E.3 Analyse des Invasionsverhaltens

E.3.1 Etablierung des Transwell-Assay für SAOS-2-EGFP

Zur Beurteilung des Invasionsvermögens von SAOS-2, wurden stabil pEGFP-N3-transfizierte Zellklone in den sog. Transwell-Assay eingesetzt. Diese im Verlauf dieser Arbeit etablierte Methode ermöglichte es, die Zellinvasion im Fluoreszenz-Mikroskop in Echtzeit zu verfolgen, ohne den Versuchsansatz aufgrund von Färbe-Schritten abbrechen zu müssen. Die Methode setzte voraus, dass eine homogene Population EGFP-N3-transfizierter SAOS-2 Zellen vorlag, was durch klonale Expansion einzelner Populationen erreicht wurde.

Hierzu wurden verschiedene Parameter des Assays variiert, um die für die Zelllinie optimalen Invasions-Bedingungen zu identifizieren. Allerdings zeigten SAOS-2 Zellen nach 48 Stunden

trotz Optimierung verschiedenster Parameter nur eine maximale Invasionsrate von 1,44 %. Die Zusammensetzung aller durchgeführten Ansätze ist in Tabelle E-1 zusammengefasst.

Tab. E-1: Zusammensetzung der Transwell-Assays zur Untersuchung des Invasionsvermögens von SAOS-2-EGFP.

Zellzahl	Human-serum	Poren-weite	hECM	Medium Oberes Kompartiment	Medium Unteres Kompartiment	Invasionsrate nach 48 h
5.000 10.000 15.000 20.000	9,1 %	5 µm	10 µg	McCoy's 30 % FBS	DMEM Nutridoma	0,04 % 0,01 % 0,08 % 0,09 %
20.000 40.000	9,1 %	5 µm	5 µg 10 µg 5 µg 10 µg	McCoy's 30 % FBS	DMEM Nutridoma	0,82 % 0,27 % 1,44 % 0,69 %
20.000 40.000	9,1 %	5 µm	keine, nur Migration	McCoy's 30 % FBS	DMEM Nutridoma	unzählbar viele
50.000 10 % 15 % 20 %	9,1 %	5 µm	10 µg	McCoy's 10 % FBS	DMEM Nutridoma	0,82 % 0,72 % 0,70 % 1,06 %
50.000 15 %	10 %	8 µm	10 µg	McCoy's 10 % FBS	DMEM Nutridoma	0,52 % 0,38 %
50.000 15 % 20 %	10 %	5 µm	10 µg	McCoy's 10 % FBS	McCoy's	0,01 % 0,03 % 0,01 %
50.000 15 % 20 %	10 %	8 µm	10 µg	McCoy's 10 % FBS	McCoy's	0,17 % 0,03 % 0,13 %
50.000 15 % 20 %	10 %	8 µm	10 µg	McCoy's 10 % FBS	DMEM Nutridoma	0,01 % 0,08 % 0,13 %

Aufgrund dieser sehr niedrigen Invasionsrate wurde eine weitere mesodermale Tumorzelllinie (HT1080) hinsichtlich ihres Invasionsverhaltens untersucht.

E.3.2 Analyse des Invasionsverhaltens von HT1080-EGFP Zellen

Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens im Transwell-Assay wurden HT1080 Zellen unter den gleichen Bedingungen wie SAOS-2 mit EGFP-N3 transfiziert, G418 selektioniert und klonal expandiert. Anschließend wurden auch für diese Zelllinie die optimalen Invasionsbedingungen ermittelt. Dabei erwies sich eine Zellzahl von 50.000 im oberen Kompartiment des Transwell-Assays als besonders geeignet. Die Beschichtung der Membran (Porenweite: 5 μm) erfolgte mit 10 μg hECM der Firma BD Biosciences (USA). Im Invasionsversuch wurde DMEM Nutridoma appliziert. Durch die Verwendung steigender Konzentrationen von Humanserum (10, 15 und 20 %) wurde die optimale Menge des Chemoattractant evaluiert.

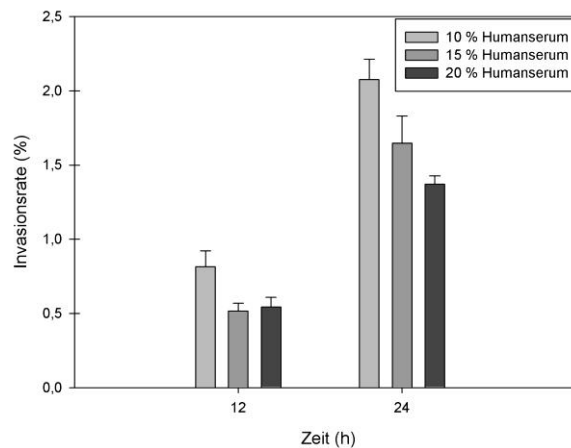


Abb. E-4: Invasionsraten von HT1080 Zellen bei verschiedenen Humanserum-Konzentrationen über 12 und 24 Stunden.

Dabei stellte sich heraus, dass eine Verdopplung der Invasionszeit mit einer ca. 2fachen Steigerung der Invasionsrate einherging.

Des Weiteren wurde bei einer Humanserum-Konzentration von 10 % die höchste Invasionsrate festgestellt. Diese betrug nach 24 Stunden ungefähr 2 %, nahm aber mit steigender Konzentration des Chemoattractant ab.

E.4 Nachweis von Wnt/ β -Catenin abhängiger Signaltransduktion mittels TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen

E.4.1 Generierung funktionsfähiger TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen

Mit dem Ziel nachzuweisen, wie sich Veränderungen des Fzd-Expressionsprofils auf die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin auswirken, wurden HT1080 Zellen mit dem Reporterplasmid pN3-BAR-GLuc stabil transfiziert, mittels G418 selektioniert und anschließend drei der gewonnenen Klone expandiert.

Zur Überprüfung der Reportereigenschaften von HT1080 Zellen, welche das TCF/LEF-Reporter-Plasmid stabil inkorporiert hatten, wurden zwei der Zellklone mit LiCl in einer Endkonzentration von 4 mM stimuliert. Das Kultivierungsmedium enthielt bei diesen Klonen zunächst FBS in einer Endkonzentration von 10 %.

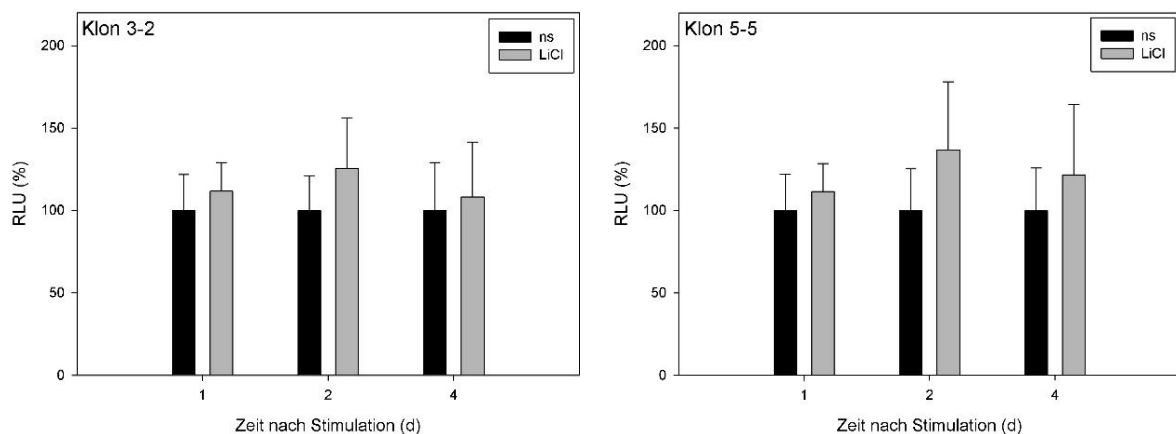


Abb. E-5: Gaussia-Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 nach LiCl-Stimulation in Kultivierungsmedium mit 10 % FBS.

RLU: relative light units

ns: nicht stimuliert

Bei Klon 3-2 wurde an Tag 2 eine Zunahme der Gaussia-Luciferase-Aktivität von ca. 25 %, bei Klon 5-5 eine Zunahme von ca. 35 % gemessen. Unter diesen Versuchsbedingungen lies sich eine Induzierbarkeit der TCF/LEF-HT1080 mit statistischer Signifikanz nicht eindeutig nachweisen.

In der AG Neth wurde etwa zur gleichen Zeit von Herrn Simon Geimer wurde in TCF/LEF-Reporter-hMSCs bei einer FBS-Konzentrationen von 2 % deutlich höhere Reportergergenaktivi-

täten nachgewiesen. Dementsprechend wurde der dritte Klon 3-1 mit 4 mM LiCl in einem Kultivierungsmedium, welches 2 % FBS enthielt, stimuliert.

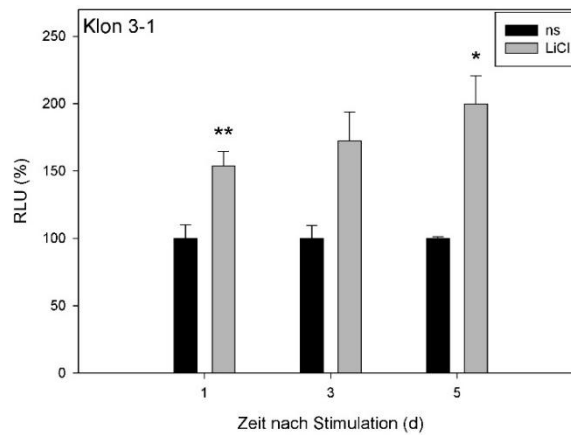


Abb. E-6: Gaussia-Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 nach LiCl-Stimulation. Die FBS-Konzentration im Kultivierungsmedium betrug 2 %.

RLU: relative light units

ns: nicht stimuliert

Nach der Stimulation mit LiCl ließ sich unter diesen Bedingungen an allen untersuchten Tagen eine signifikante Zunahme der Gaussia-Luciferase messen. Dabei nahm mit anhaltender Inkubation mit LiCl auch die Sekretion der Luciferase an Tag 5 um bis zu 100 % zu, was für eine gute Induzierbarkeit dieses TCF/LEF-Reporter-HT1080-Zellklons sprach.

E.4.2 Reportergenaktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen nach Knockdown einzelner Fzd-Rezeptoren

Um zu eruieren, in welcher Weise die einzelnen Fzd-Rezeptoren zum Aktivierungszustand des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beitragen, wurde mittels RNAi ein Knockdown des jeweiligen Fzd-Rezeptors in TCF/LEF-Reporter-HT1080 durchgeführt. Um die Knockdown-Effizienz zu überprüfen, wurde von den einzelnen Fzd-siRNA transfizierten HT1080 Zellen an Tag 1, 3 und 5 Gesamt-RNA isoliert und nach reverser Transkription die Fzd-Kopienzahlen mittels qRT-PCR ermittelt.

Tab. E-2: Knockdown-Effizienzen in HT1080 nach siRNA-Knockdown von Fzd1-7

	Knockdown-Effizienz an Tag 1	Knockdown-Effizienz an Tag 3
Fzd1	89 %	89 %
Fzd2	85 %	49 %
Fzd3	95 %	89 %
Fzd4	93 %	80 %
Fzd5	98 %	84 %
Fzd6	81 %	38 %
Fzd7	43 %	24 %

Im Rahmen eines weiteren Versuchsansatzes wurden nach siRNA-vermitteltem Knockdown an Tag 1, 3 und 5 Zellüberstände abgenommen, um die Aktivität des Reporterproteins Gaussia-Luciferase quantifizieren zu können.

Dabei ergaben sich in Abhängigkeit des jeweiligen Fzd-Rezeptor-Knockdowns divergente Auswirkungen bzgl. des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. So zeigte sich bei RNA gegen Fzd1, 2, 3, 4, 5 und 7 eine erniedrigte Reporterogenaktivität (Abb. E-7).

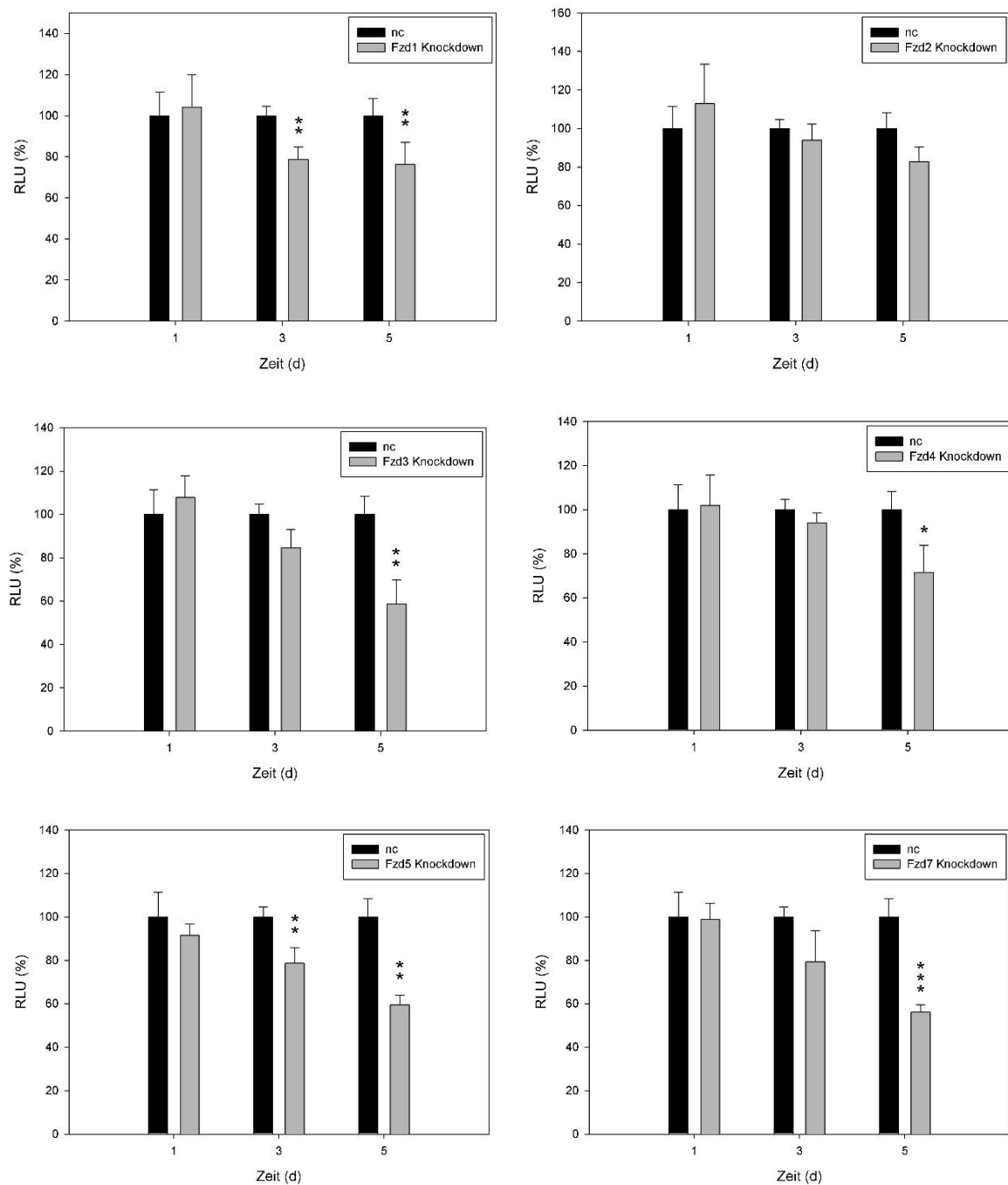


Abb. E-7: Gaussia-Luciferase-Aktivität nach RNAi-Knockdown von Fzd1, 2, 3, 4, 5 und 7.
RLU: relative light units, normiert auf Gesamtprotein

Andererseits war bei einem Knockdown von Fzd6 zunächst eine Zunahme der Gaussia-Luciferase-Aktivität zu beobachten (Abb. E-8). Diese betrug 50 % an Tag 1.

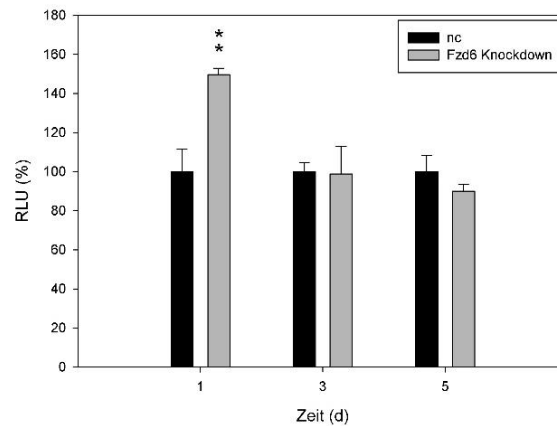


Abb. E-8: Gaussia-Luciferase-Aktivität nach RNAi-Knockdown von Fzd6.
RLU: relative light units, normiert auf Gesamtprotein

E.4.3 Rezeptorgenaktivität in TCF/LEF-Reporter HT1080 nach Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 bzw. Fzd3 und 5

Aufgrund der Gegebenheit, dass die einzelnen Knockdowns von Fzd1, 3 und 5 jeweils mit einer deutlichen Reduktion der Gaussia-Luciferase Aktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 einhergingen, sollte im nächsten Ansatz geprüft werden, ob durch Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 bzw. Fzd3 und 5 mittels RNAi eine noch stärkere Reduktion der Gaussia-Luciferase-Aktivität - und damit der transkriptionell aktiven Fraktion von β -Catenin - erreicht werden konnte.

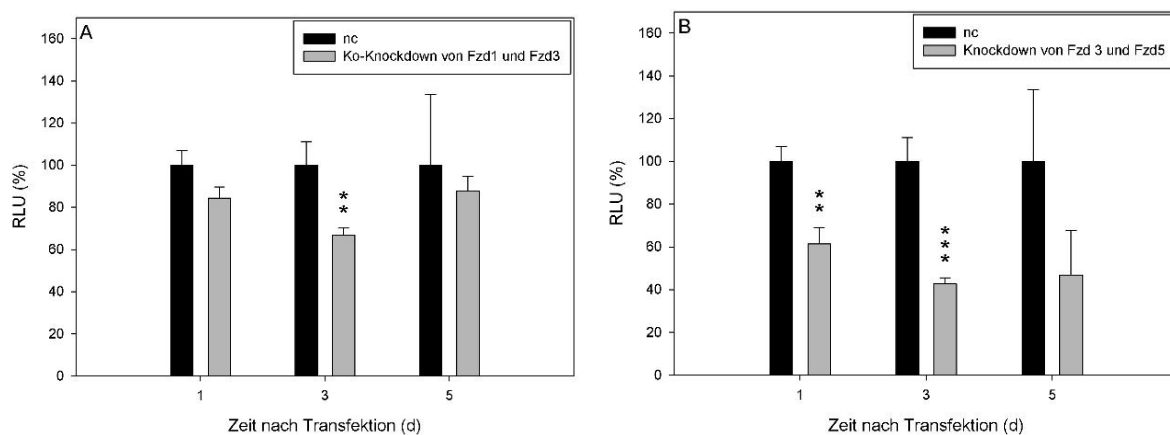


Abb. E-9: Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 bzw. Fzd3 und 5.
RLU: relative light units, normiert auf Gesamtprotein

Die Gaussia-Luciferase-Aktivität wurde an Tag 1, 3 und 5 nach Ko-Knockdown der jeweiligen Fzd-Rezeptoren gemessen. Nc-siRNA-transfizierte TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen dienten jeweils als Normierungskontrolle (100 %).

Das Experiment zeigte, dass sowohl der Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 als auch der von Fzd3 und 5 mit einer nachhaltigen Abnahme der Gaussia-Luciferase-Sekretion assoziiert war. Vergleicht man beide Ko-Knockdown-Ansätze am Tag 3, so ergab sich im Falle der RNAi gegen Fzd1 und 3 eine Abnahme der Gaussia-Luciferase-Aktivität von 43 %, während die Herabregulation von Fzd3 und 5 mit einer Reduktion der Reporterprotein-Aktivität von 57 % einherging.

E.5 Untersuchung der Fzd8-Funktion in HT1080 Zellen

E.5.1 Knockdown von Fzd8 in HT1080 Zellen

Aufgrund der sehr hohen Expression von Fzd8 in HT1080 Zellen wurde der Frage nachgegangen, in welchem Ausmaß Fzd8 das Invasions- und Proliferationsverhalten dieser Tumorzelllinie beeinflusst. Hierzu wurde dieser Rezeptor mittels RNAi-Technologie herabreguliert.

Da der Knockdown der gegen Fzd8 gerichteten siRNA in früheren Versuchen von Frau Dr. Marisa Karow eine relativ geringe Effizienz aufwies, wurde eine zweite siRNA gegen Fzd8 entworfen. Allerdings lag die Knockdown-Effizienz dieser siRNA in einem ähnlichen Bereich wie die der Ersten. Daher wurden beide siRNAs unter für HT1080 etablierten Bedingungen kotransfiziert und an Tag 1, 3 und 5 die Restexpression von Fzd8 mittels qRT-PCR bestimmt.

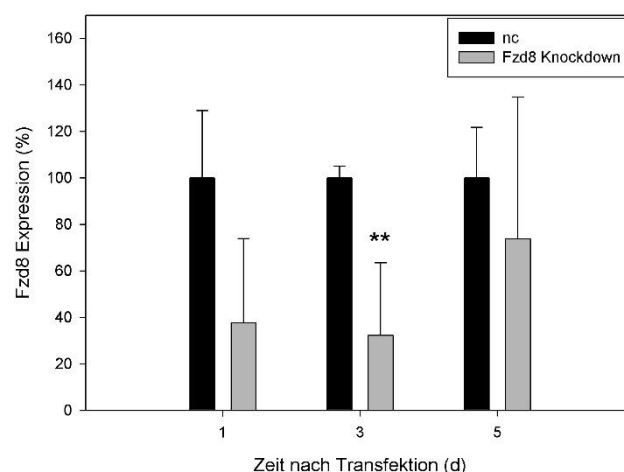


Abb. E-10: siRNA-vermittelte Knock-Down-Effizienzen von Fzd8 in HT1080.

Die Knockdown-Effizienz wurde an Tag 1, 3 und 5 nach Kotransfektion von zwei unterschiedlichen Fzd8-siRNAs bestimmt. Die Normierung erfolgte über nc-siRNA-transfizierte Kontroll-HT1080 Zellen.

Durch Kotransfektion der beiden Fzd8-siRNAs konnte an Tag 1 eine Knockdown-Effizienz von 62 %, an Tag 3 von 68 % und an Tag 5 von 26 % erreicht werden.

E.5.2 Invasionsverhalten von HT1080 Zellen nach Fzd8-Knockdown

Da sich HT1080 Zellen sowohl durch eine starke Expression von Fzd8 als auch durch ein ausgeprägtes Invasions- und Proliferationsverhalten auszeichneten, war es von Interesse zu untersuchen, ob bzw. inwiefern diese zellulären Eigenschaften mit der Präsenz von Fzd8 assoziiert sind. Hierzu wurde zunächst das Invasionsverhalten von HT1080 Zellen nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Fzd8 evaluiert.

Nach Transfektion von HT1080-EGFP Zellen mit den beiden siRNAs gegen Fzd8 erfolgte 6 Stunden nach Transfektion die Abnahme des Transfektionsansatzes vom Zellrasen. Die Zellen wurden danach direkt in den Transwell-Assay eingesetzt und die Invasionseigenschaften unter den für HT1080 Zellen etablierten Bedingungen für 24 bzw. 48 Stunden untersucht.

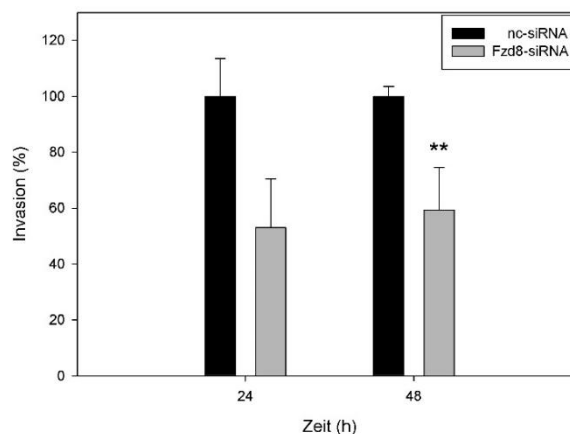


Abb. E-11: Invasionsverhalten von HT1080-Zellen nach Knockdown von Fzd8

Invasionsraten von nc-siRNA-transfizierten HT1080-EGFP Zellen wurden jeweils als 100 % gesetzt und mit den Fzd8-siRNA-transfizierten HT1080-EGFP-Zellen verglichen.

Aus Abb. E-11 ergibt sich, dass die Invasionsrate nach Fzd8-Knockdown im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten HT1080 nach 24 Stunden um 47 % und nach 48 Stunden um 41 % vermindert war.

E.5.3 Proliferationsverhalten von HT1080 Zellen nach Knockdown von Fzd8

HT1080 Zellen zeichnen sich durch eine sehr hohe basale Proliferationsrate aus. Deshalb wurde die Bedeutung von Fzd8 hinsichtlich des HT1080-Proliferationsverhaltens evaluiert.

Hierzu wurden HT1080 Zellen mit siRNAs gegen Fzd8 transfiziert und für 5 Tage kultiviert. Anschließend wurden mittels des CyQuant-Assay-Proliferation-Kits die Zellzahlen bestimmt.

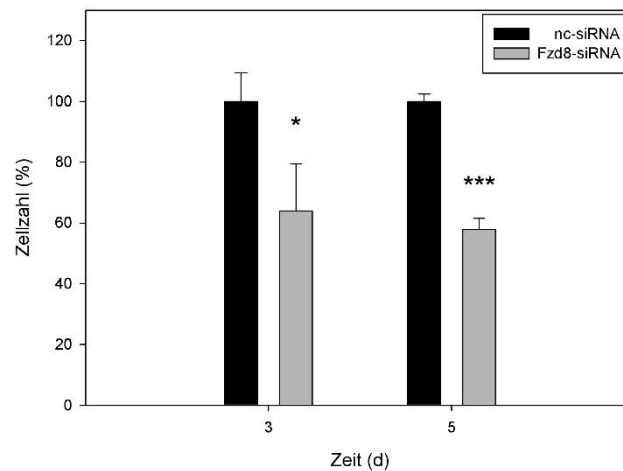


Abb. E-12: Proliferationsverhalten von HT1080 Zellen nach Knockdown von Fzd8
Zellzahlen von nc-siRNA-transfizierten HT1080 wurden jeweils als 100 % gesetzt.

Hierbei zeigte sich bei HT1080 Zellen ein deutlicher Proliferationsrückgang nach Knockdown von Fzd8. Die Zellteilungsrate war an Tag 3 um 36 % und an Tag 5 um 42 % vermindert.

E.5.4 Regulation der Fzd8-Expression durch Wnt3a in HT1080 Zellen

Aufgrund der Tatsache, dass Frau Dr. M. Karow im Rahmen ihrer Dissertation festgestellt hatte, dass die Expression von Fzd8 in hMSC durch den kanonischen Liganden Wnt3a herabreguliert wird, was auf den Status eines negativen Wnt-Zielgens hinweist (Karow, Popp et al. 2009), sollte in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob bzw. inwiefern auch in HT1080 Zellen die Expression von Fzd8 der Regulation durch Wnt3a unterliegt. Dazu wurden HT1080 Zellen mit rekombinantem Maus (rm)-Wnt3a in Konzentrationen von 50, 100 und 150 ng/ml stimuliert. Für Longitudinaluntersuchungen wurde die Stimulation nach einem Tag sowie nach drei Tagen durch die Isolierung der RNA beendet, woraufhin die Quantifizierung der Fzd8-mRNA-Transkripte mittels qRT-PCR erfolgte.

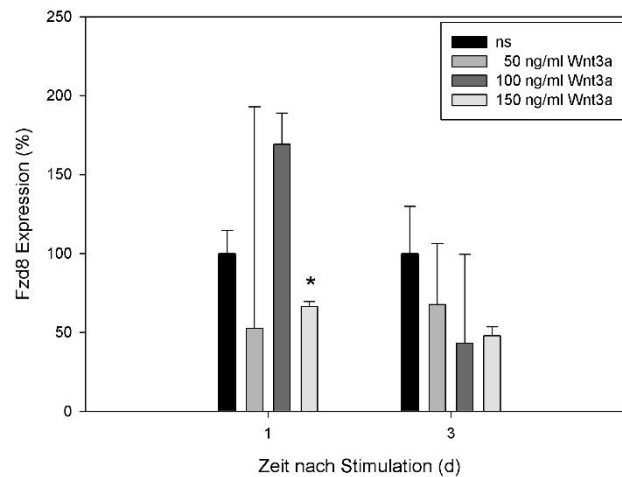


Abb. E-13: Fzd8-mRNA-Expression nach Stimulation mit Wnt3a.

Die Fzd8-Expression von nicht-stimulierten HT1080 Zellen wurde als 100 % gesetzt.

Die bereits in hMSC beobachtete negative Abhängigkeit der Fzd8-Expression vom Wnt3a-Signal konnte somit auch in HT1080 bestätigt werden. So zeigte sich an Tag 1 eine Wnt3a-konzentrationsabhängige Herabregulation von Fzd8 (ca. 33 % an Tag 1 bei 150 ng/ml Wnt3a).

E.6 Einfluss von IGFBP-4 auf den Wnt-/β-Catenin Signalweg in HT1080

E.6.1 Cyclin D1-Expression in HT1080 Zellen nach Stimulation mit IGFBP-4

Da IGFBP-4 als Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalweges an Fzd8 und den Ko-Rezeptor LRP6 bindet, sollte in der hier vorliegenden Arbeit eruiert werden, ob bzw. inwiefern dieser Inhibitionsmechanismus auch in HT1080-Zellen zum Tragen kommt, zumal diese Tumorzelllinie durch eine besonders hohe Fzd8-Expression gekennzeichnet ist.

Aufgrund der Tatsache, dass bei der IGFBP-4-vermittelten Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalweges auch dem Ko-Rezeptor LRP6 eine entscheidende Bedeutung zukommt, wurde das basale mRNA-Expressionsmuster von LRP6 in HT1080 sowohl im Vergleich zu LRP5 als auch hinsichtlich der Expression in SAOS-2 und hMSC komparativ evaluiert. Hierfür wurde aus unstimulierten HT1080, SAOS-2 und hMSC Gesamt-RNA isoliert, jeweils gleiche Mengen cDNA synthetisiert und im Anschluss mittels qRT-PCR das Expressionslevel von LRP5 und LRP6 quantitativ bestimmt.

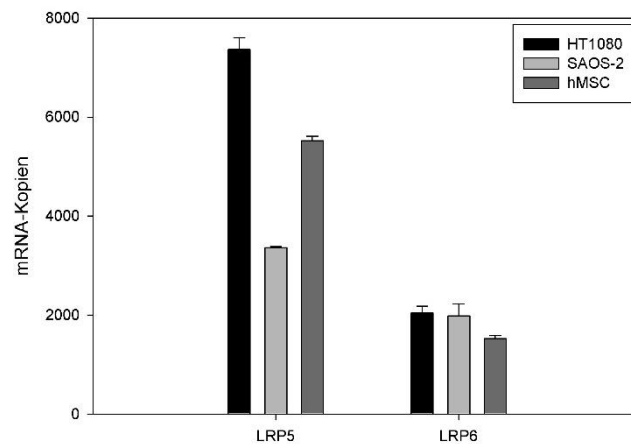


Abb. E-14: Basales mRNA-Expressionsprofil der Wnt-Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6 in HT1080, SAOS-2 und hMSC.

Die Expressionslevel von beiden LRPs wurden absolut quantifiziert.

Das Experiment zeigte, dass in den untersuchten Zellpopulationen sowohl LRP5 als auch LRP6 exprimiert werden. Dabei fiel auf, dass LRP5 im Vergleich zu LRP6 in HT1080 Zellen, SAOS-2 Zellen und hMSC stärker exprimiert wurde. So betrug beispielsweise die Expression von LRP6 in HT1080 im Vergleich zu LRP5 nur 28 %.

Mit dem Ziel zu analysieren, welchen Einfluss IGFBP-4 auf den Aktivierungsstatus des Wnt/ β -Catenin-Signalweg in HT1080 Zellen haben würde, wurden die Zellen mit rekombinantem humanen IGFBP-4 in einer Konzentrationsreihe von 50, 200 und 1000 ng/ml stimuliert. Im Rahmen von Longitudinaluntersuchungen wurde die Stimulation nach 6, 12 und 24 Stunden durch die Isolierung der RNA beendet. Nach cDNA-Synthese wurde die Kopienzahl von Cyclin D1, welches ein etabliertes Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges darstellt (Tetsu and McCormick 1999), mittels qRT-PCR bestimmt.

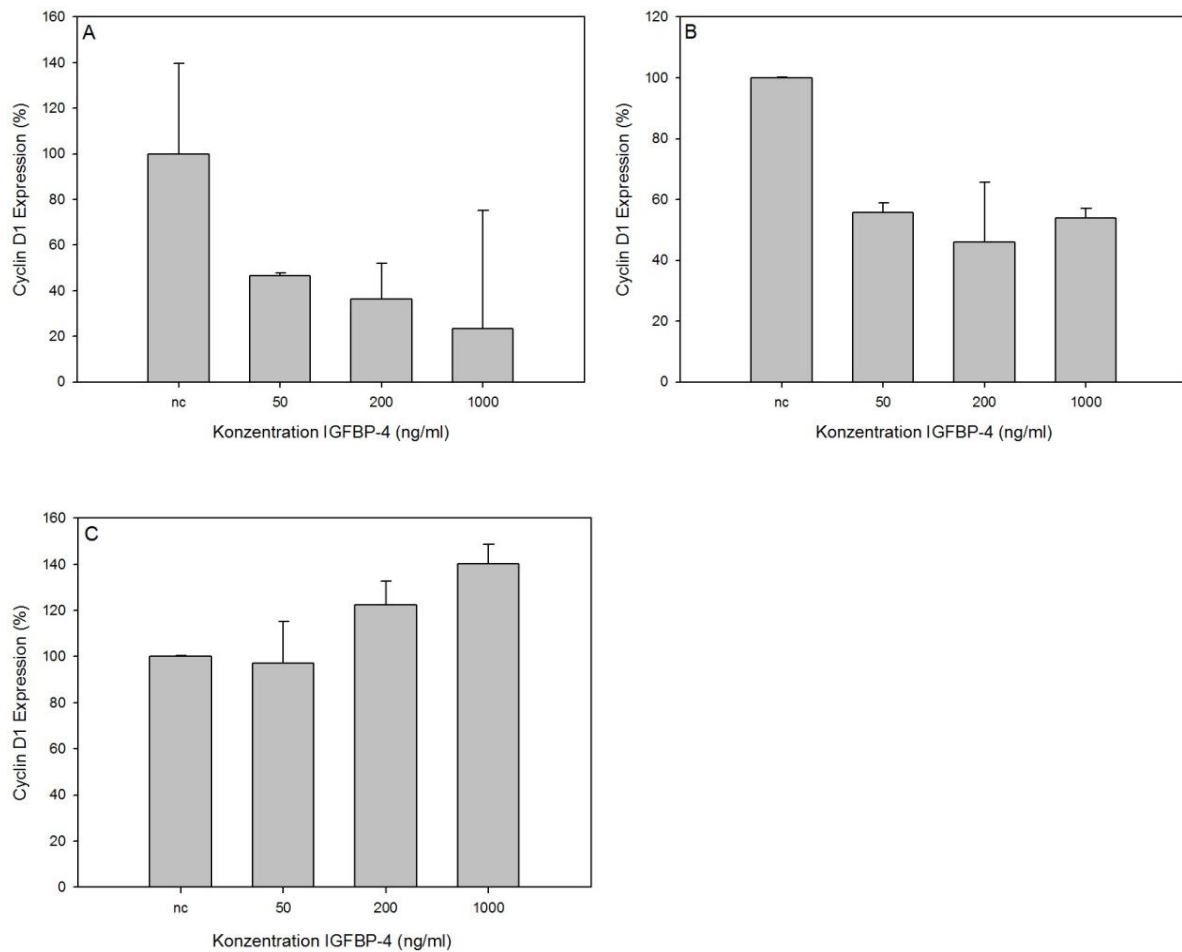


Abb. E-15: Cyclin D1-mRNA-Expression in HT1080 Zellen nach Stimulation mit IGFBP-4

- A)** Nach 6 Stunden
- B)** Nach 12 Stunden
- C)** Nach 24 Stunden

Bereits 6 Stunden nach IGFBP-4 Applikation zeigte sich bei einer Konzentration von 1000 ng/ml eine Abnahme der Cyclin D1 Expression von 77 %. Nach 12 Stunden zeigten alle stimulierten Zellen eine vergleichbare Cyclin D1-Expressionsverringering (ca. 50 %). Im Gegensatz dazu war nach 24 Stunden in den mit 200 bzw. 1000 ng/ml IGFBP-4-stimulierten Ansätzen eine gesteigerte Cyclin D1 Expression zu verzeichnen. Aufgrund der hohen Standardabweichung handelt es sich nur um richtungsweisende Werte ohne statistische Signifikanz.

E.6.2 IGFBP-4-abhängige Auswirkungen auf die Reporteraktivität in TCF/LEF-Reporter HT1080 Zellen

Nachdem in vorangegangenen Versuchen bereits eine Herabregulierung des Wnt-Zielgens Cyclin D1 nach Stimulation mit IGFBP-4 zu beobachten war, sollte mit Hilfe von TCF/LEF-

Reporter-HT1080 Zellen der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Interaktion von IGFBP-4 mit Fzd8 und LRP6 die intrazelluläre Lokalisation von β -Catenin beeinflussen würde.

Zu diesem Zweck wurden TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen mit 50, 100 und 200 ng/ml IGFBP-4 stimuliert. In den zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommenen Überständen wurde anschließend die Aktivität des Reporterproteins Gaussia-Luciferase quantifiziert.

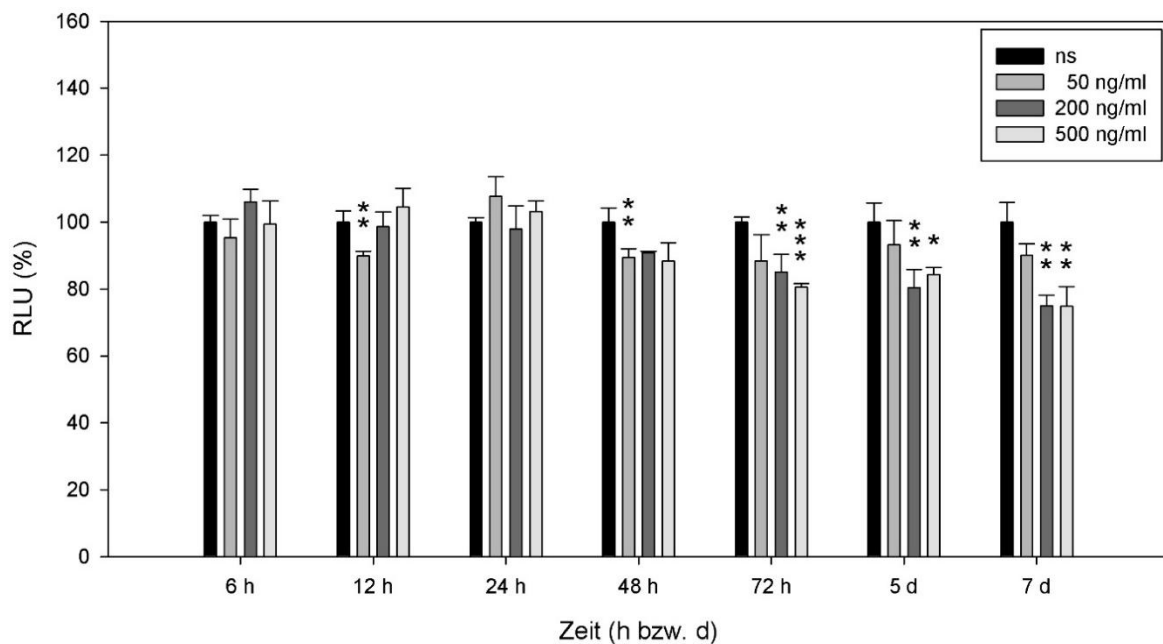


Abb. E-16: Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit IGFBP-4 in TCF/ LEF-Reporter-HT1080

RLU: relative light units

ns: nicht stimuliert

Das Experiment zeigte, dass es durch Stimulation mit IGFBP-4 ab Tag 2 zu einem Rückgang der Gaussia-Luciferase-Sekretion - und damit zu einem erhöhten Abbau von β -Catenin - kam. Dieser Effekt wurde vor allem an Tag 5 und 7 sehr deutlich, zu diesem Zeitpunkt bewirkten IGFBP-4-Konzentrationen von 100 bzw. 200 ng/ml Erniedrigungen der Gaussia-Luciferase-Aktivität von bis zu 25 %. Gleichzeitig wurde deutlich, dass innerhalb des Konzentrationsbereiches von 100 und 200 ng/ml kaum mehr Unterschiede in der Reporterprotein-Aktivität zu verzeichnen waren.

Um auszuschließen, dass durch in HT1080 Zellen Faktoren sezerniert werden, welche zu einem vorzeitigen Abbau von IGFBP-4 führen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem TCF/LEF-Reporter-HT1080 über 9 Tage mit IGFBP-4 stimuliert wurden. Dabei wurde an

Tag 2, 4, 6 und 8 jeweils ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei die jeweiligen IGFBP-4 Mengen in den entsprechenden Konzentrationen (100 bzw. 200 ng/ml) zugegeben wurden. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass IGFBP-4 über den Stimulationszeitraum in gleich bleibender Menge zur Verfügung stand.

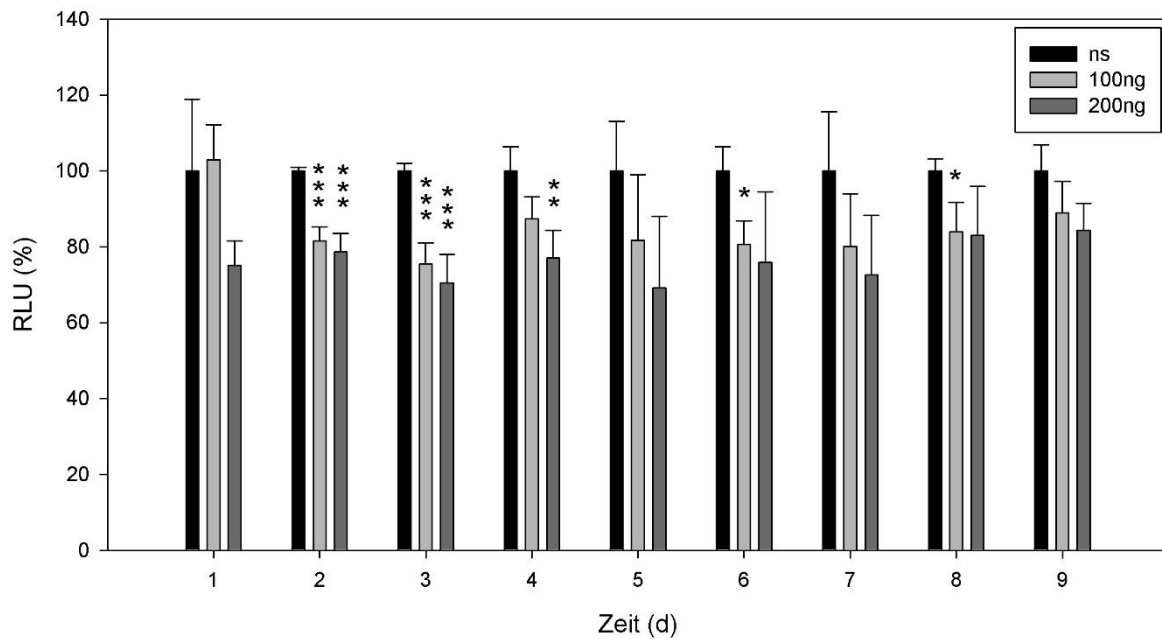


Abb. E-17: Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IGFBP-4 in einem Zeitraum von 9 Tagen.

RLU: relative light units

ns: nicht stimuliert

Die Ergebnisse zeigten, dass man durch wiederkehrende Applikation von IGFBP-4 eine anhaltende Verminderung von β -Catenin-abhängiger Luciferase Sekretion erreichen kann. An Tag 3 und 5 ergab sich bei IGFBP-4 Konzentrationen von 200 ng/ml eine Verminderung der Gaussia-Luciferase-Sekretion von bis zu 30 %. Im Rahmen der Standardabweichung konnte zwischen den Konzentrationen 100 und 200 ng/ml kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

F Diskussion

F.1 Basales Fzd-Expressionsmuster

F.1.1 Basales Fzd-Expressionsmuster in SAOS-2 Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnten in SAOS-2 Zellen die in der Literatur beschriebenen Fzds 1-8 nachgewiesen werden. Da die zusätzlich existierenden Fzd-Rezeptoren Fzd9 und 10 in vorangegangenen Arbeiten an hMSCs (Kolben, Perobner et al. 2012) ein sehr geringes Expressionsniveau aufwiesen, wurde in den Versuchen an SAOS-2 auf ihre Quantifizierung verzichtet.

Sämtliche Expressionsniveaus wurden in Bezug auf einen Normwert, welcher Fzd7 als 100 % darstellte, gesetzt. Dadurch ergaben sich relativ hohe Expressionsniveaus von Fzd1, 2, 7 und 8, wobei mit Abstand das höchste Niveau Fzd1 mit 313 % aufwies. Geringere Expressionsniveaus zeigten Fzd3, 4, 5 und 6. Hier war Fzd4 mit der geringsten Expression von 6 % zu eruieren.

Wie unterschiedlich die Expressionsniveaus der Fzd-Rezeptoren auf der Oberfläche von verschiedenen Tumorzelllinien sind, zeigt ein Vergleich mit den Ergebnissen von Bengochea et al. mit Zellen des hepatozellulären Karzinoms. Hier zeigten sich vor allem die mRNA-Level von Fzd3, Fzd6 und, wie in SAOS-2, von Fzd7 erhöht (Bengochea, de Souza et al. 2008).

F.1.2 Basales Fzd-Expressionsmuster in HT1080 Zellen

Ebenso wie in SAOS-2 konnten Fzd1-8 auch in HT1080 nachgewiesen werden. Auf den Nachweis von Fzd9 und Fzs10 wurde wie bei den Osteosarkomzellen verzichtet. Er erfolgte analog zu den Vorversuchen mit SAOS-2 eine Normierung der unterschiedlichen Expressionsniveaus auf Fzd7 als 100 %.

Besonders auffällig in der Quantifizierung zeigte sich hier Fzd8 mit dem bei Weiten höchsten Expressionsniveau von 2018 % im Vergleich zu Fzd7. Die übrigen Fzds lagen bezüglich ihrer Expression in deutlich niedrigeren Bereichen von 255 % (Fzd6) bis 10 % (Fzd5).

Eine übermäßige Expression von Fzd8 wurde 2012 von der Arbeitsgruppe von Wang nachgewiesen (Wang, Xu et al. 2012). In dieser Arbeitsgruppe konnte in verschiedenen Lungenkarzinom Zelllinien (A549, H1299, H1650, A427 und H322) sowie in menschlichen Lungenkarzinom Gewebeproben eine deutlich erhöhte Fzd8 Expression nachgewiesen werden.

Diese Studie weist darauf hin, dass deutlich erhöhte Fzd8 Expressionsniveaus mit einem deregulierten Wnt/ β -Catenin-Signalweg einhergehen, wodurch die Entwicklung von Lungenkarzinomen begünstigt wird.

Neuere Studien an invasiven Formen des Kolon-Karzinoms zeigen, dass insbesondere Fzd1 im Tumor-Mikroenvironment der Darmmukosa exprimiert wird und von dort aus Einfluss auf die in der Nähe liegenden neoplastischen Zellen nimmt (Planutis, Planutiene et al. 2013).

Je nach Tumorzelltyp kann es zu einer Überexpression bestimmter Fzds kommen. So zeigen sich in Medulloblastomen erhöhte Expressionslevel von Fzd2 (Salsano, Pattera et al. 2012), während in proliferativen Regionen von kolorektalen Karzinomen, hepatozellulären Karzinomen sowie dem Triple-Negative Mamma Karzinom (negativ für die Mutationen an ER, PR und Her2) eine deutlich erhöhte Expression von Fzd7 nachgewiesen werden konnte (Stine, Walton et al. 2015).

Im Bereich der mesenchymalen Zellreihe wurde das Expressions-Niveau der Fzds an humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) eingehend von Kolben et al. untersucht (Kolben, Perobner et al. 2012). Dort zeigte sich auf mRNA-Ebene die höchste Expression für Fzd1 und Fzd2, wobei Fzd3 am niedrigsten und Fzd9 und Fzd10 nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnten.

Wie an den in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorzellen mesenchymalen Ursprungs (SAOS-2, HT1080) gezeigt, lassen sich auch in anderen mesenchymalen Tumorzellen, wie dem synovialen Sarkom und dem Ewig Sarkom, unterschiedliche Expression-Muster der Fzds nachweisen (synoviales Sarkom: Überexpression von Fzd 10, Ewig Sarkom: Expression von Fzd 2, 3, 4, 7 und 8; Fzd1, 6, 9 und 10 werden nicht exprimiert) (Uren, Wolf et al. 2004; Nagayama, Fukukawa et al. 2005).

F.2 Stabile Transfektion von mesenchymalen Tumorzellen (SAOS-2/HT1080) mit pEGFP-N3

Um das Invasionsverhalten von SAOS-2 und HT1080 unter den Untersuchungsbedingungen *in vitro* verfolgen zu können, wurden von beiden Zell-Linien Klone hergestellt, welche stabil mit dem Vektor pEGFP-N3 transfiziert waren.

GFP (green fluorescent protein) ist ein von der Qualle *Aequiorea victoria* produziertes Protein, dessen Photoprotein Aequorin Licht produziert, sobald es Ca^{2+} bindet (Shimomura, Johnson et al. 1962). Der besondere Vorteil von GFP in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen liegt darin, dass diese GFP ohne zusätzliche Genprodukte von *A. victoria* exprimieren können. Zum Nachweis der Genaktivität und Protein-Verteilung in Zellen sind neben GFP bereits einige Methoden, wie die Bildung von Fusionsproteinen mit codierenden Sequenzen für β -Galactosidase, Firefly Luciferase und bakterielle Luciferase, bekannt. Ihre Verwendung im lebenden Gewebe ist jedoch limitiert, da zu ihrer Detektion Co-Faktoren und Substrate zugefügt werden müssen. GFP hingegen scheint nicht mit Zellwachstum und -funktion zu intervenieren, so dass Vermehrung und Bewegungen von Zellen *in situ* beobachtet werden können (Chalfie, Tu et al. 1994). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete EGFP (enhanced green fluorescent protein) muss mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden um grünes Licht zu emittieren (Cormack, Valdivia et al. 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte stabile Transfektion erfolgte mit dem Vektor pEGFP-N3. Dieser Vektor ermöglicht einen non-viralen Gentransfer von EGFP und dessen stabile Expression (Hoelters, Ciccarella et al. 2005).

Die von Hoelters et al. durchgeführte Transfektion von pEGFP-N3 wurde mit Hilfe des Transfektions-Reagens Lipofectamine 2000 in hMSCs mit Transfektionseffizienzen von mehr als 92 % durchgeführt. In den in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien (SAOS-2/HT1080) lag die Transfektionseffizienz mit Lipofectamine 2000 bei ebenfalls ca. 90 %.

Zur Selektion der transfizierten Zellklone erfolgte wie bei Hoeltes et al. die Zugabe von Neomycin (G418) in das Kultivierungsmedium. Die Zellen, welche durch Aufnahme des Vektors pEGFP-N3 eine Neomycin-Resistenz erworben hatten, überlebten diese Behandlung und konnten weiter kultiviert werden (Hoelters, Ciccarella et al. 2005).

Um einzelne stabil transfizierte Zell-Klone zu expandieren kamen Klonierungszyylinder zum Einsatz. Diese Methode wurde auch durch Geerts et al. zur Selektion einzelner Zell-Klone von Keratinozyten bei MD-EBS (Epidermolysis bullosa simplex mit Muskeldystrophie)(Geerts, Fontao et al. 1999) und jüngst durch Park et al. bei Brustkrebs-Zelllinien (Park, Son et al. 2016) angewendet. Alternativ zu den Klonierungszyindern (oder auch -Ringen) sind auf dem Markt auch sterile, runde Papierplättchen zum Picken einzelner Zellklone erhältlich. Auch mit der Pipettenspitze allein wären einzelne Klone auswählbar gewesen. Aufgrund der ausgeprägten Adhärenz der SAOS-2 und HT1080 Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings die Klonierungszyylinder präferiert, da in ihnen das langsame Auf- und Abpipettieren zum Mobilisieren der Zellen möglich war.

F.3 Analyse des Invasionsverhaltens

F.3.1 Etablierung des Transwell-Assays für SAOS-2-EGFP

Bei SAOS-2-EGFP Zellen zeigte sich trotz Optimierung verschiedenster Parameter nur eine maximale Invasionsrate von 1,44 % nach 48stündiger Inkubation. Um dieses Ergebnis zu erreichen, wurden Costar-Transwell-Filter 6,5 mm mit 5 µm Porendurchmesser (Corning, Niederlande) mit 40.000 Zellen inkubiert, welche im Vorfeld mit DMEN und 9,1 % Humanserum kultiviert worden waren. Die eigentliche Invasion erfolgte über eine hECM im Bereich der Poren-Membran, welche in einer Menge von 5 µg aufgebracht worden war. Zum Invasionsversuch wurden die Zellen auf das obere Kompartiment in McCoy's mit 30 % FBS aufgebracht. Die Invasion wurde richtungsgebend durch das Chemoattractant DMEM Nutridoma im unteren Kompartiment durchgeführt. Nach 48 Stunden wurde das gesamte Well gezählt und in das Verhältnis zur eingesetzten Zell-Zahl gesetzt.

In den bereits publizierten Invasions-Versuchen mit SAOS-2 Zellen von Hoang et al. fällt auf, dass die verwendeten Zellen vor Versuchsbeginn in α -MEM gemischt mit 20 % FBS kultiviert worden waren. Zusätzlich wurde der eigentliche Invasionsversuch mit zwar gleicher Zellmenge, aber Serum-freiem Medium im oberen Kompartiment und α -MEM mit 10 % FBS im unteren Kompartiment durchgeführt. Möglicherweise führte diese Kombination aus „hungrigen“ Zellen im oberen und dem Chemoattractant FBS im unteren Kompartiment zu höheren Invasionsraten. Über absolute Zellzahlen wird in der Arbeit aus dem Jahre 2004 keine

Aussage gemacht. Alle Angaben beziehen sich auf einen sogenannten Invasionsindex, welcher sich aus dem Quotient

$$\frac{\text{Zahlzahl der invasiven Zellen durch beschichtete Membran}}{\text{Zellzahl der migrierten Zellen durch unbeschichtete Membran}} \times 100$$

berechnet. Die Zell-Zahl wurde aus den gezählten Zellen aus fünf der invasionsreichsten Felder in 200facher Vergrößerung berechnet. Ein weiterer Unterschied bestand zusätzlich in Matrigel als verwendete Membran-Beschichtung und einer Porengröße von 8 µm (Hoang, Kubo et al. 2004).

Die Theorie, dass sehr geringe Konzentrationen an verwendetem Serum im oberen Kompartiment zu besonders invasiven Zellen führen könnten, wird bestärkt durch einen weiteren Invasionsversuch mit der Osteosarkom-Zell-Reihe MG-63. Diese wurden bereits in der Nacht vor Versuchsbeginn in Serum-freiem Medium kultiviert. Der Invasionsversuch wurde ebenfalls im serumfreien oberen Kompartiment mit 10 %igem FBS als Chemoattractant durchgeführt. Obwohl auch in dieser Arbeit keine absoluten Zellzahlen angegeben sind, waren die Unterschiede in den Invasionsraten zwischen den Serum-frei kultivierten Zellen und der Negativ-Kontrolle signifikant detektierbar (Jianwei, Fan et al. 2013).

In einem weiteren Experiment von Ek et al. wurden mit 50.000 SAOS-2 Zellen im serumfreien oberen Kompartiment und 10 % FCS (fetal calf serum) im unteren Kompartiment Invasionszahlen (Matrigel Beschichtung) von 650 Zellen in einem repräsentativen Feld verzeichnet. Über das Ausmaß des Feldes wird keine Aussage gemacht, allerdings würden im Bereich dieses Feldes bereits Invasionsraten von 1,3 % erreicht. Auffällig in diesem Aufbau ist die zusätzlich relativ lange Versuchsdauer von 72 Stunden (Ek, Dass et al. 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SAOS-2 Zellen wurden im Rahmen des Invasionsversuches nicht in Serum-freiem Medium kultiviert und auch im eigentlichen Invasionsversuch wurde nicht mit Serum-freiem Medium im oberen Kompartiment gearbeitet. Möglicherweise erklärt sich hieraus ihre mangelnde Invasionsrate, welche in der Konsequenz zu einem Wechsel der Zelllinie führte.

F.3.2 Analyse des Invasionsverhaltens von HT1080-EGFP Zellen

Um weitere Untersuchungen der Fzd-Rezeptoren und ihren Einfluss auf das Invasionsverhalten von Zellen zu untersuchen, wurde auf die Fibrosarkomzellen HT1080 zurückgegriffen. Bereits 1994 wurden diese Zellen und ihr exzellentes Invasionsverhalten im Vergleich zu den nicht entdifferenzierten Fibroblasten-Zellen MRC-5 (human embryonic fibroblasts) von Iwamoto et al. beschrieben (Iwamoto, Tanaka et al. 1994). HT1080 Zellen werden Aufgrund ihres ausgeprägten Invasionsverhaltens in vitro häufig als Positivkontrolle für Invasionsversuche eingesetzt (Chang, Pieretti-Vanmarcke et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Optimierung die Invasionsassays unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 50.000 Zellen, Porenweite 5 μ m, Konzentration von 10 μ g hECM der Firma BD Biosciences (USA). Aufgrund des Proliferationsverhaltens von HT1080 Zellen kam es bei einer Verdopplung der Invasionszeit zu einer 2fachen Steigerung der Invasionsrate. Zusätzlich wurde bei Verwendung verschiedener Konzentrationen von Humanserum (10, 15 und 20 %) als Chemoattractant bei einer Konzentration von 10 % Humanserum die höchste Invasionsrate festgestellt.

Bezüglich der verwendeten Konzentrationen an Chemoattractant variieren in der publizierten Literatur die Angaben nachhaltig: So werden Konzentrationen an FCS/FBS von 1 % (Herr, Kotha et al. 2013) über 5 % (Schaser, Wrede et al. 2011) bis hin zu 10 % (Furmanova-Hollenstein, Broggini-Tenzer et al. 2013) angegeben.

Dass bei höheren Konzentrationen an Chemoattractant geringere Invasionsraten nachweisbar waren kann mehrere Ursachen haben: Einerseits scheint es möglich, dass durch den Versuchsaufbau durch das vorherrschende größere Konzentrationsgefälle zwischen DMEM Nutridoma und dem 15%-20%igen Serum-DMEMNutridoma-Gemisch ein rascherer Konzentrationsausgleich zwischen unterem und oberem Kompartiment stattfand. Somit wurde die eigentliche Wirkung des Chemoattractant abgeschwächt. Andererseits könnten höhere Konzentrationen von Humanserum eine Änderung des Mikromilieus bzw. eine Modulation der Zellumgebung bewirkt haben, wodurch die Invasivität beeinflusst wurde. Durch Bouterfa et al. wurde 1999 an 4 humanen Glioblastomzellarten und 4 humanen Melanomzellarten eine unterschiedliche Expression an Proteinen der extrazellulären Matrix in Abhängigkeit des Serumgehalts im Kulturmedium festgestellt, die mit deutlichen Veränderungen des Invasions- und Migrationsverhaltens einhergingen (Bouterfa, Darlapp et al. 1999).

F.4 Nachweis von Wnt/ β -Catenin abhängiger Signaltransduktion mittels TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen

F.4.1 Generierung funktionsfähiger TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen

Von Peröbner et al. wurde ein TCF/LEF-Reporterplasmid namens pN3-BAR-GLuc konstruiert, welches die β -Catenin abhängige transkriptionelle Aktivität in hMSC anhand des sezernierten Reporter-Proteins Gaussia-Luciferase anzeigte. In diesem Plasmid pN3-BAR-GLuc sind 12 zusätzliche TCF/LEF-Konsensussequenzen vor dem Reporter-Gen der Gaussia Luciferase geschaltet, wodurch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Detektion der sezernierten Gaussia Luciferase quantifiziert werden kann (Perobner, Karow et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden HT1080-Zellen mit pN3-BAR-GLuc stabil transfiziert, um weitere Untersuchungen an diesen Zellen im Bezug auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vornehmen zu können. Zur Effizienzanalyse der generierten TCF/LEF-Reporterzellklone wurden diese mit LiCl stimuliert. LiCl hat die Eigenschaft die GSK-3 β abhängige Phosphorylierung von β -Catenin zu inhibieren. Dies führt zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und Nukleus, wodurch spezifische Wnt-Zielgene vermehrt exprimiert werden. Eine Stimulierung mit LiCl bewirkt somit die Nachahmung einer Wnt-Aktivierung (Stambolic, Ruel et al. 1996).

In den selektionierten und ausgewählten Klonen 3-2 und 5-5 kam es initial nach einer Stimulierung mit LiCl zu einer Zunahme der Gaussia-Luciferase-Aktivität von maximal 25% und 35% unter herkömmlichen Zellkulturbedingungen mit 10% FBS. Unter Kultivierung mit 2% FBS nahm die Sekretion der Gaussia-Luciferase um bis zu 100% zu, was für eine bessere Induzierbarkeit der TCF/LEF-Reporter HT1080 in Serum-armem Kulturmedium sprach.

In der Literatur gibt es zahlreiche Bestrebungen Ersatz für die gängigen Zellkultur-Methoden unter Verwendung von FBS oder FCS zu finden. Neben kompetitiven Effekten um Rezeptorbindungsstellen (Lu and Sharom 1995) sind auch Unterschiede in der Expression von Differenzierungsmarkern (He, Zhang et al. 2011) und Veränderungen physiologischer Untersuchungsbedingungen, wie z.B. Reduzierung von synaptischen Interaktionen an Neuronenzellen, beschrieben (Freschi 1982). Auch die Expansion humaner Immunzellen zur Zelltherapie im Menschen scheint unter Kultivierung in FBS bedenklich zu sein (Neron, Roy et al. 2011), so dass zunehmend streng definierte (Kinard, De Clercq et al. 1990) oder filtrierte

Medien (Bouterfa, Darlapp et al. 1999) sowie spezielle Zellunterlagen wie Graphene (Kalbacova, Broz et al. 2012) verwendet werden.

F.4.2 Reporter-genaktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen nach Knockdown einzelner Fzd-Rezeptoren

Nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Fzd1 bis Fzd7 wurde in den Zellüberständen die Aktivität der Gaussia-Luciferase und somit die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges bestimmt. Nach Knockdown von Fzd1, 2, 3, 4, 5 und 7 konnte eine erniedrigte Reporter-genaktivität nachgewiesen werden, wohingegen nach Knockdown von Fzd6 zunächst eine Zunahme der Gaussia-Luciferase-Aktivität beobachtet werden konnte.

Diese Ergebnisse sind teilweise kongruent zu den Daten von Kolben et al.. Dieser konnte in TCF/LEF-Reporter hMSCs nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Fzd 2, 5 und 6 einen leichten aber nicht signifikanten Abfall der Gaussia-Luciferase-Aktivität beobachten. Lediglich eine RNAi gegen Fzd7 zeigte im hMSC-Versuch eine signifikante Verminderung der Gaussia-Luciferase-Aktivität. Nach zusätzlicher Stimulation des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Wnt3a konnte nach Knockdown von Fzd1, 5 und 7 eine signifikant erniedrigte Reporter-genaktivität in hMSCs nachgewiesen werden (Kolben, Perobner et al. 2012). Hieraus konnte sowohl in hMSCs als auch in HT1080 für Fzd1, 5 und 7 ein aktivierender Einfluss auf das β -Catenin-vermittelte Zellsignal nachgewiesen werden. Die in HT1080 stark signifikante Verminderung der Reporteraktivität der Gaussia-Luciferase nach Knockdown von Fzd3 konnte in hMSC nicht gezeigt werden (Kolben, Perobner et al. 2012).

Dass sowohl Fzd5 und Fzd7 in den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg involviert sind und dort am ehesten regulierende Eigenschaften besitzen, wurde auch von Kemp et al. 2011 gezeigt, als gereinigte sezernierte Formen der extrazellulären CRD von Fzd 5 und Fzd7 die durch Wnt3a induzierte β -Catenin-Akkumulation in L-Zellen antagonisierten und damit die spontane Formation des Mesoderm in Mausembryonen inhibierten (Kemp, Willems et al. 2007). Besonders bezüglich Fzd7 wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor zur Selbsterneuerung in humanen embryonalen Stammzellen beiträgt (Melchior, Weiss et al. 2008), wobei die Signalmechanismen und die verantwortlichen Liganden bis jetzt nicht identifiziert bzw. charakterisiert wurden.

F.4.3 Rezeptorgenaktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 nach Ko-Knockdown von Fzd1 und 3 bzw. Fzd3 und 5

Da in HT1080 durch den siRNA vermittelten Knockdown von Fzd1, Fzd3 und Fzd5 verminderte Reporter-genaktivitäten nachgewiesen werden konnten, wurden mit diesen Rezeptoren weitere Ko-Knockdown Experimente durchgeführt. Dabei sollte analysiert werden, ob deren gleichzeitiger Knockdown die Reporter-genaktivität weiter vermindern würde.

Im Ko-Knockdown mittels RNAi gegen Fzd1 und Fzd3 zeigte sich eine Abnahme der Gaussia-Luciferase-Aktivität um 43 %. Somit konnte gezeigt werden, dass durch gleichzeitigen Knockdown von Fzd1 und Fzd3 eine deutlich niedrigere Rezeptorgenaktivität erreicht werden konnte als durch den Knockdown der Einzelrezeptoren (Fzd1 21 %, Fzd 3 10 %). Ebenso kam es durch Ko-Knockdown von Fzd3 und Fzd5 zu einer Abnahme der Gaussia-Luciferaseaktivität um 57%, welche ebenfalls die Erniedrigung der Rezeptorgenaktivität des Einzelknockdowns von (Fzd3 10 %, Fzd5 16 %) deutlich übertraf.

Ähnliche Versuchsansätze wurden von Thomas Kolben in hMSCs durchgeführt. Dort konnte als Reporter-gen für eine positive Regulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges Fzd7 identifiziert werden. Durch Ko-Knockdown von Fzd1 und Fzd5 zeigte sich, dass die Expression von Fzd7 im unstimulierten Zustand durch den Knockdown deutlich vermindert und durch Stimulation durch Wnt3a nur in geringem Maße induzierbar war (Kolben 2010).

Bezüglich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Rezeptoren wurde bezüglich Fzd1 beschrieben, dass durch dessen Bindung mit Wnt eine TCF-abhängige Transkription induziert wird (Gazit, Yaniv et al. 1999). Hinsichtlich Fzd3 liegen differenzierte Angaben vor: einerseits aktiviert in *Xenopus* Fzd3 in Abwesenheit exogener Liganden den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Umbhauer, Gosset 2000), andererseits wurde von Holmen et al. 2002 beschrieben, dass der Komplex aus Fzd3 und Wnt8 in *Xenopus* zu einer geringen Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signales führt (Holmen, Salic et al. 2002). Ein Fusionsprotein aus *Xenopus* Wnt8 und Fzd5 hingegen führt zusammen mit LRP6 zu einer deutlichen Aktivierung eines Wnt-responsiven Promotors sowie zur Entwicklung einer zweiten Achse in *Xenopus*, ohne jedoch eine Erhöhung des intrazellulären β -Catenin-Levels zu bewirken (Holmen, Salic et al. 2002).

F.5 Untersuchung der Fzd8-Funktion in HT1080 Zellen

F.5.1 Invasions- und Proliferationsverhalten von HT1080 Zellen nach Fzd8-Knockdown

In vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass die Rolle des Fzd8-Rezeptors in HT1080 Zellen sehr prominent ist. Aufgrund seiner, im Vergleich zu Fzd7, 20fach erhöhten Expression wurde eine detaillierte Untersuchung in den verwendeten Fibrosarkom-Zellen HT1080 durchgeführt.

Den generellen Einfluss des Fzd8-Rezeptors auf das kanonische Wnt/ β -Catenin-Signal machen frühe Experimente von Ito et al. aus dem Jahre 1998 deutlich, in denen gezeigt werden konnte, dass in *Xenopus* durch Überexpression von Fzd8 eine zweite Körperachse und die Entwicklung einer prominenten Kopfstruktur induziert wird. Die Kopfentwicklung wurde durch Co-Expression von GSK3 β oder einer dominant negativen Form von *Xenopus*-Dishevelled blockiert, was suggeriert, dass der durch *Xenopus*-Frizzled8 ausgelöste Effekt eine Wnt-Transduktion benötigt (Itoh, Jacob et al. 1998). Später konnte gezeigt werden, dass *Xenopus*-Fzd8 auch bei der Entwicklung der Nierengänge während der Embryonalentwicklung beteiligt ist. So konnte sich bei *Xenopus*-Fzd8-inhibierten Zellen keine adäquate Epithelstruktur des Nierentubulus ausbilden (Satow, Chan et al. 2004).

Eine Überexpression von Fzd8 in Tumorzellen konnte von Wang et al. 2012 im menschlichen kleinzelligen Lungenkarzinom nachgewiesen werden (Wang, Xu et al. 2012). Auch in 4 von 7 Magenkarzinom-Zelllinien (Kirikoshi, Sekihara et al. 2001) und in Zelllinien des Triple-Negative-Breast-Cancer war eine erhöhte Fzd8-Expression detektierbar (Yin, Xu et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HT1080 Zellen der Knock-Down von Fzd8 zu einem verminderten Invasions- und Proliferationsverhalten führte. Ähnliche Beobachtungen, insbesondere des Proliferationsverhaltens, konnten in o.g. Zellen des menschlichen kleinzelligen Lungenkarzinoms gemacht werden. Ein Knock-Down mit Fzd8shRNA inhibierte die Zellproliferation mit gleichzeitig verminderter Aktivität des Wnt-Signals-Weges in vitro und suppressierte das 1549 Xenokraft Model des kleinzelligen Lungenkarzinom in vivo. Zusätzlich konnte eine erhöhte Sensibilität der Fzd8-Knock-Down-Zellen gegenüber der Chemotherapie mit Taxotere beobachtet werden (Wang, Xu et al. 2012). Eine ähnliche Sensibilität gegenüber Chemotherapie mit Cisplatin und Bestrahlung konnten auch Yin et al. 2013 bei der Triple-Negative-Breast-Cancer Zelllinie CRL2335 TNBC nach Fzd8

Knock Down nachweisen. Eine siRNA-vermittelte Inhibition von Fzd8 reduzierte die detektierbare Konzentration an β -Catenin und Survivin und erhöhte durch Cisplatin und Bestrahlung die Apoptoserate. Somit weisen die Daten der hier vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Yin et al. darauf hin, dass ein Knockdown von Fzd8 die Effizienz von herkömmlichen Tumorthérapien erhöhen könnte (Yin, Xu et al. 2013).

Bezüglich des Einflusses des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signales auf das Invasionsverhalten von Tumorzellen wurden Untersuchungen mit SFRP1 und SFRP2 durchgeführt, deren Re-Expression eine verminderte Invasionsrate in Cervix-Karzinom-Zellen bewirkte (Chung, Lai et al. 2009). Außerdem konnten Ueno et al. nachweisen, dass ein siRNA Knockdown von Fzd7 mit einer verminderten Invasionsrate in vitro einherging (Ueno, Hazama et al. 2009).

Die herausragende Bedeutung von Fzd8 wird durch Beobachtungen von DeAlmeida et al. deutlich. In dieser Arbeit wurde durch Fusion der CRD-Domäne von Fzd8 und Fc ein Konstrukt generiert (F8CRDhFc), welches autokrin das Wnt-Signal in Teratom-Zellen in vitro inhibiert. In vivo verminderte F8CRDhFc dabei das Wachstum von Xenograft-Teratomen (DeAlmeida, Miao et al. 2007).

F.5.2 Regulation der Fzd8-Expression durch Wnt3a in HT1080 Zellen

In vorangegangenen Arbeiten von Marisa Karow und Thomas Kolben konnte gezeigt werden, dass die Expression von Fzd8 in hMSCs einer Regulation von Wnt3a unterliegt. Dabei war durch Stimulation von humanen mesenchymalen Stammzellen mit Wnt3a eine Reduktion von Fzd8 auf mRNA Ebene detektierbar (Karow 2008, Kolben 2010).

Auch in HT1080 Zellen konnten diese Beobachtungen gezeigt werden. Hierzu wurden die Fibrosarkomzellen mit Wnt3a stimuliert, welches in muriner isolierter Form vorlag. Wnt3a gilt als aktivierende und positiv regulierende Komponente des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Willert, Brown et al. 2003).

Eine negative Rückkopplung der Fzd8-Rezeptor-Expression und somit eine inverse Regulierung von Fzd8 durch das kanonische Wnt/ β -Catenin-Signal konnte somit auch für HT1080 Zellen nachgewiesen werden. Insbesondere an Tag 1 nach Stimulation mit 150 ng/ml kam es zu einer signifikanten Reduktion der Fzd8 Transkripte auf mRNA-Ebene, an Tag 3 nach Stimulation war die negative Rückkopplung durch Wnt3a deutlich schwächer ausgeprägt.

Hierbei wird die Diskrepanz zwischen den Experimenten mit hMSC und HT1080 Zellen deutlich. Durch die massive Proliferationsrate der HT1080 Zellen ist es vorstellbar, dass es bereits innerhalb von 3 Tagen zu einem sog. "Wash-out" von Wnt3a kam, wodurch eine weitere Stimulation abgeschwächt wurde. Im Gegensatz dazu waren in hMSCs die Effekte der Wnt3a-Stimulation vor allem an Tag 3 maximal und teilweise bis Tag 7 detektierbar (Karow 2008, Kolben 2010).

Anhand der Versuchsergebnisse lässt sich ableiten, dass Fzd8 wohl ein negativ reguliertes Zielgen des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signals darstellt. Kommen den meisten Wnt-Zielgenen eher proliferations- und differenzierungsfördernde Aufgaben zu, sind nur wenige Mechanismen bekannt, welche mit einer negativen Rückkopplung des Wnt/ β -Catenin-Signal assoziiert sind. So ist bekannt, dass EphB3 und sein Ligand Ephrin-B1 bei der Regeneration intestinaler Epithelien invers durch β -Catenin und TCF reguliert wird (Batlle, Henderson et al. 2002). Des Weiteren inhibiert β -Catenin die Differenzierung von mesenchymalen Zellen in Runx2 und Sox9-positiven Skelett-Vorläufer-Zellen (Hill, Spater et al. 2005) und unterdrückt die p16INK4a-Expression in Melanozyten (Delmas, Beermann et al. 2007). Weitere Beispiele für eine negative Regulation durch Komponenten des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signals sind Tcf3 bezüglich des Nanog (Pereira 2006) sowie Hath1 in kolorektalen Zelllinien (Leow, Romero et al. 2004) und RANKL in der Osteoblastenregulation (Spencer, Utting et al. 2006).

F.6 Einfluss von IGFBP-4 auf den Wnt-/ β -Catenin Signalweg in HT1080 Zellen

Um die hemmende Wirkung von IGFBP-4 in HT1080 via Fzd8 und LRP6 nachvollziehen zu können (Zhu, Shiojima et al. 2008), musste zunächst neben Fzd8 auch LRP6 in den verwendeten HT1080 Zellen nachgewiesen werden.

Die Expression von LRP6 in HT1080 konnte in der vorliegenden Arbeit auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Im Vergleich mit SAOS-2 und hMSCs zeigte sich in den untersuchten Zelllinien eine im Verhältnis zu LRP5 reduzierte endogene Expression von LRP6. Insbesondere die im Vergleich zu LRP5 verminderte Expression von LRP6 in frühen Passagen von hMSCs wurde von Peröbner et al. ebenfalls beschrieben (Peröbner, Karow et al. 2012).

Der vergleichsweise geringe Expressionsgrad von LRP6 in HT1080 konnte auch von Yonghe Li et al. gezeigt werden. In den dabei untersuchten Zelllinien (humanes Kolonkarzinom, Mamma-Karzinom-Zellen und Lungen-Karzinom) zeigten HT1080 Zellen die geringste Expression von LRP6. Stabile Expression von LRP6 führte aber auch in HT1080 zu erhöhtem Wnt/ β -Catenin-Signal und vermehrter Zellproliferation (Li, Lu et al. 2004).

Die prädominante Wirkung von LRP6 auf den Wnt-/ β -Catenin Signalweg wurde kürzlich in mehreren Arbeiten beschrieben. Besonders im Gegensatz zu dem zu ca. 71% homologen LRP5 kommt LRP6 herausragende Bedeutung zu (Joiner, Ke et al. 2013). Wie von Peröbner et al. gezeigt, bewirkt ein Knockdown von LRP6 in Anwesenheit von Wnt3a, im Vergleich zu LRP5, eine starke Abnahme des Wnt/ β -Catenin-Signals in hMSCs (Peröbner, Karow et al. 2012). Ebenso konnte von Ring et al. gezeigt werden, dass in HEK293 das erzeugte β -Catenin Signal streng abhängig vom Vorhandensein von LRP6 ist (Ring, Neth et al. 2014).

Vor diesem Hintergrund sollte nun in HT1080 eruiert werden, ob bzw. inwieweit durch IGFBP-4 über Fzd8 und LRP6 Einfluss auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg ausgeübt wird.

F.6.1 Cyclin D1-Expression in HT1080 Zellen nach Stimulation mit IGFBP-4

Zunächst wurde anhand von Cyclin D1, welches ein etabliertes Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges darstellt (Tetsu and McCormick 1999), gezeigt, dass eine Stimulation von HT1080 mit IGFBP-4 mit einer initialen Abnahme der Aktivität des kanonischen Wnt-/ β -Catenin Signalweges einhergeht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch in HT1080 Zellen eine negative Regulierung des Wnt-/ β -Catenin Signalweges vorliegt, welche auch durch Zhu et al. 2008 in den Kardiomyozyten-Progenitor-Zellen P19CL6 beschrieben wurde (Zhu, Shiojima et al. 2008). Dabei konnte die verminderte Expression von Cyclin D1 auch in einer Dosis-Abhängigkeit von IGFBP-4 gezeigt werden.

Wurde von Zhu et al. die Hemmung des Wnt-/ β -Catenin Signalweges als eine von IGF unabhängige Funktion dargestellt, gibt es in der Literatur zahlreiche Angaben über eine IGF-abhängige Funktion von IGFBP-4. Hierbei kommt IGFBP-4 am ehesten die Funktion zu, IGF-gefördertes Wachstum von Tumorzellen durch dessen Bindung zu unterbinden (Damon, Maddison et al. 1998). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in IGFBP-4 transfizierten Prostatakarzinomzellen eine, im Vergleich zur Kontrolle, reduzierte Proliferationsfähigkeit vorlag.

Interessanterweise zeigt sich im vorliegenden Versuchsaufbau in HT1080 nach der 24-stündigen Detektion eine vermehrte Expression von Cyclin D1. Dieses Phänomen ist am ehesten durch den proteolytischen Abbau und die damit nachlassende suppressierende Wirkung von IGFBP-4 zu erklären.

Einen anderen Ansatz liefert die Gruppe um Ueno et al. 2011. Hier konnte in humanen Nierenzellkarzinomzellen gezeigt werden, dass die Expression von IGFBP-4 zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von Tcf und damit zu einer verstärkten Aktivität von β -Catenin führt. Damit einhergehend kam es in den IGFBP-4 transfizierten Tumorzellen zu vermehrtem Wachstum, Invasion und Beweglichkeit der Zellen (Ueno, Hirata et al. 2011).

F.6.2 IGFBP-4-abhängige Auswirkungen auf die Reporteraktivität in TCF/LEF-Reporter-HT1080 Zellen

Neben der Detektion von Cyclin D1 wurde auch der Aktivierungsgrad des TCF/LEF-Reportersystems unter Stimulation mit IGFBP-4 gemessen, um dessen Einfluss auf das kanonische Wnt/ β -Catenin Signal zu untersuchen. Hierbei zeigte sich in TCF/LEF-Reporter-HT1080 ab Tag 2 ein signifikanter Rückgang der Gaussia-Luciferase-Aktivität, was einem gesteigerten Abbau von β -Catenin entspricht. Somit konnte auch im TCF/LEF-Reportersystem der hemmende Einfluss von IGFBP-4 auf das kanonische Wnt-/ β -Catenin Signal reproduziert werden. Es wurde ein Rückgang der Gaussia-Luciferase-Aktivität um bis zu 25% erreicht.

In einem erweiterten Versuchsansatz konnte durch einen Wechsel des Kulturmediums, welches mit jeweils frischem IGFBP-4 versetzt war, sogar ein signifikanter Rückgang der Gaussia-Luciferase-Aktivität um 30% an Tag 3 nachgewiesen werden.

Dass IGFBP-4 in Kultivierungsmedien instabil ist und im Gegensatz zu seinem Agonisten Wnt nicht autokrin reguliert wird, wurde von Minato et al. 2011 beschrieben. Um die im dortigen Versuchsansatz verwendeten Cardiomyozyten-Vorläuferzellen zur Wnt-inhibierten Differenzierung zu bewegen, wurde der Abbau von IGFBP-4 durch Fusion mit einem Elastin-ähnlichen Polypeptid durchgeführt (Minato, Ise et al. 2012).

Erst jüngst konnte die entscheidende Rolle von IGFBP-4 in der Differenzierung zu Cardiomyozyten unterstrichen werden. Dabei konnte in iPSC die Expression von kardiogenen Markern Nkx 25, α -MHC, α -actinin und Troponin I durch Stimulation mit IGFBP-4 signifikant gesteigert werden und zwar durch die inhibierende Wirkung von IGFBP-4 auf die β -Catenin-

Aktivität. Dabei kamen die Autoren zu dem Schluss, dass IGFBP-4 in murinen iPSCs die Proliferation und Differenzierung zu Cardiomyozyten fördert, indem es den β -Catenin Signalweg inhibiert (Xue, Yan et al. 2014).

G Ausblick

Dass dem kanonischen Wnt-/β-Catenin Signal eine Schlüsselrolle sowohl in der embryonalen Entwicklung, als auch in der Entstehung von Neoplasien zukommt, konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden (Polakis 2000; Miller 2002), (van Es, Barker et al. 2003), (Gregorieff and Clevers 2005). Jedoch bestehen noch Unklarheiten bezüglich der genauen Pathomechanismen, in welche die einzelnen Komponenten des kanonischen Wnt-/β-Catenin Signals involviert sind, um die Entwicklung überschießender Zellproliferation bzw. -invasion zu begünstigen.

Zentraler Fokus der vorliegenden Arbeit stellten die Oberflächenrezeptoren des kanonischen Wnt-/β-Catenin Signals, insbesondere Fzd8, dar. Durch Knockdown von Fzd8 konnten sowohl die Proliferations- als auch die Invasionsraten von HT1080 reduziert werden. Zusätzlich konnte in Form von IGFBP-4 ein Antagonist des kanonischen Wnt-/β-Catenin Signales in HT1080 identifiziert werden. Ob es sich hierbei, wie bei Cardiomyozyten-Vorläuferzellen, um einen Antagonismus via Fzd8 handelt, muss in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Das Expressionsmuster ist deshalb von vorrangigem Interesse, da hierdurch Fzd-Expressionsprofile von Tumorzellen erstellt werden können, durch die gezielte Therapien entwickelbar sind. Dadurch könnte durch Knockdown-Strategien einzelner Schlüsselrezeptoren ein wichtiger Schritt hinsichtlich einer gezielten Tumorbehandlung gegangen werden.

So existiert aktuell der Antikörper OMP-18R5 (Handelsname: Vantictumab), welcher an Fzd1, Fzd2, Fzd5, Fzd7 und Fzd8 bindet. Interessanterweise handelt es sich hierbei um die Fzd-Rezeptoren, welche dem kanonischen Wnt-/β-Catenin Signal zugeordnet werden. In menschlichen Tumor-Xenograft-Modellen in Mäusen führte eine Behandlung mit OMP-18R5 zu reduziertem Tumorzellwachstum, unter anderem bei Brust-, Pankreas-, Kolon- und Lungenkarzinomen (Gurney, Axelrod et al. 2012), (Madan and Virshup 2015).

H Literaturnachweis

- Adler, P. N. and H. Lee (2001). "Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 635-640.
- Ahumada, A., D. C. Slusarski, et al. (2002). "Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP." Science **298**(5600): 2006-2010.
- Arce, L., N. N. Yokoyama, et al. (2006). "Diversity of LEF/TCF action in development and disease." Oncogene **25**(57): 7492-7504.
- Ashton-Rickardt, P. G., M. G. Dunlop, et al. (1989). "High frequency of APC loss in sporadic colorectal carcinoma due to breaks clustered in 5q21-22." Oncogene **4**(10): 1169-1174.
- Axelrod, J. D., J. R. Miller, et al. (1998). "Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways." Genes Dev **12**(16): 2610-2622.
- Batlle, E., J. T. Henderson, et al. (2002). "Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB." Cell **111**(2): 251-263.
- Behrens, J., B. A. Jerchow, et al. (1998). "Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta." Science **280**(5363): 596-599.
- Bengochea, A., M. M. de Souza, et al. (2008). "Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma." Br J Cancer **99**(1): 143-150.
- Bhanot, P., M. Brink, et al. (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." Nature **382**(6588): 225-230.
- Bienz, M. (1998). "TCF: transcriptional activator or repressor?" Curr Opin Cell Biol **10**(3): 366-372.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Bodmer, W. F., C. J. Bailey, et al. (1987). "Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5." Nature **328**(6131): 614-616.
- Bostedt, K. T., C. Schmid, et al. (2001). "Insulin-like growth factor (IGF) I down-regulates type 1 IGF receptor (IGF 1R) and reduces the IGF I response in A549 non-small-cell lung cancer and Saos-2/B-10 osteoblastic osteosarcoma cells." Exp Cell Res **271**(2): 368-377.
- Bouterfa, H., A. R. Darlapp, et al. (1999). "Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions." J Neurooncol **44**(1): 23-33.

- Boutros, M., N. Paricio, et al. (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." Cell **94**(1): 109-118.
- Brannon, M., M. Gomperts, et al. (1997). "A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus." Genes Dev **11**(18): 2359-2370.
- Brantjes, H., J. Roose, et al. (2001). "All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors." Nucleic Acids Res **29**(7): 1410-1419.
- Brennan, K., J. M. Gonzalez-Sancho, et al. (2004). "Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins." Oncogene **23**(28): 4873-4884.
- Cabrera, C. V., M. C. Alonso, et al. (1987). "Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene." Cell **50**(4): 659-663.
- Cavallo, R. A., R. T. Cox, et al. (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." Nature **395**(6702): 604-608.
- Ceda, G. P., P. J. Fielder, et al. (1991). "Differential effects of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II on the expression of IGF binding proteins (IGFBPs) in a rat neuroblastoma cell line: isolation and characterization of two forms of IGFBP-4." Endocrinology **128**(6): 2815-2824.
- Cerro, J. A., A. Grewal, et al. (1993). "Tissue-specific expression of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) mRNAs in mouse and rat development." Regul Pept **48**(1-2): 189-198.
- Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-805.
- Chan, S. D., D. B. Karpf, et al. (1992). "Two homologs of the Drosophila polarity gene frizzled (fz) are widely expressed in mammalian tissues." J Biol Chem **267**(35): 25202-25207.
- Chang, H. L., R. Pieretti-Vanmarcke, et al. (2011). "Mullerian inhibiting substance inhibits invasion and migration of epithelial cancer cell lines." Gynecol Oncol **120**(1): 128-134.
- Chelius, D., M. A. Baldwin, et al. (2001). "Expression, purification and characterization of the structure and disulfide linkages of insulin-like growth factor binding protein-4." J Endocrinol **168**(2): 283-296.
- Cheung, P. T., E. P. Smith, et al. (1991). "Characterization of an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-4) produced by the B104 rat neuronal cell line: chemical and biological properties and differential synthesis by sublines." Endocrinology **129**(2): 1006-1015.
- Chung, M. T., H. C. Lai, et al. (2009). "SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway." Gynecol Oncol **112**(3): 646-653.

- Cohen, E. D., M. C. Mariol, et al. (2002). "DWnt4 regulates cell movement and focal adhesion kinase during *Drosophila* ovarian morphogenesis." Dev Cell **2**(4): 437-448.
- Cong, F., L. Schweizer, et al. (2004). "Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP." Development **131**(20): 5103-5115.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." Gene **173**(1 Spec No): 33-38.
- Damon, S. E., L. Maddison, et al. (1998). "Overexpression of an inhibitory insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), IGFBP-4, delays onset of prostate tumor formation." Endocrinology **139**(8): 3456-3464.
- Daniels, D. L. and W. I. Weis (2005). "Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation." Nat Struct Mol Biol **12**(4): 364-371.
- Dann, C. E., J. C. Hsieh, et al. (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." Nature **412**(6842): 86-90.
- Davidson, G., W. Wu, et al. (2005). "Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction." Nature **438**(7069): 867-872.
- DeAlmeida, V. I., L. Miao, et al. (2007). "The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo." Cancer Res **67**(11): 5371-5379.
- Delmas, V., F. Beermann, et al. (2007). "Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development." Genes Dev **21**(22): 2923-2935.
- Du, S. J., S. M. Purcell, et al. (1995). "Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos." Mol Cell Biol **15**(5): 2625-2634.
- Durai, R., M. Davies, et al. (2006). "Biology of insulin-like growth factor binding protein-4 and its role in cancer (review)." Int J Oncol **28**(6): 1317-1325.
- Ek, E. T., C. R. Dass, et al. (2007). "Pigment epithelium-derived factor overexpression inhibits orthotopic osteosarcoma growth, angiogenesis and metastasis." Cancer Gene Ther **14**(7): 616-626.
- Endo, Y., V. Wolf, et al. (2005). "Wnt-3a-dependent cell motility involves RhoA activation and is specifically regulated by dishevelled-2." J Biol Chem **280**(1): 777-786.
- Farr, G. H., 3rd, D. M. Ferkey, et al. (2000). "Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in *Xenopus* axis specification." J Cell Biol **148**(4): 691-702.
- Finch, P. W., X. He, et al. (1997). "Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6770-6775.

- Fletcher, C. D. (2006). "The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification." Histopathology **48**(1): 3-12.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-1272.
- Freschi, J. E. (1982). "Effect of serum-free medium on growth and differentiation of sympathetic neurons in culture." Brain Res **256**(4): 455-464.
- Fujino, T., H. Asaba, et al. (2003). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 229-234.
- Fukui, T., M. Kondo, et al. (2005). "Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer." Oncogene **24**(41): 6323-6327.
- Furmanova-Hollenstein, P., A. Brogгинi-Tenzer, et al. (2013). "The microtubule stabilizer patupilone counteracts ionizing radiation-induced matrix metalloproteinase activity and tumor cell invasion." Radiat Oncol **8**: 105.
- Gazit, A., A. Yaniv, et al. (1999). "Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response." Oncogene **18**(44): 5959-5966.
- Geerts, D., L. Fontao, et al. (1999). "Binding of integrin alpha6beta4 to plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding." J Cell Biol **147**(2): 417-434.
- Giese, K., J. Cox, et al. (1992). "The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures." Cell **69**(1): 185-195.
- Gregorieff, A. and H. Clevers (2005). "Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer." Genes Dev **19**(8): 877-890.
- Grimberg, A. and P. Cohen (2000). "Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis." J Cell Physiol **183**(1): 1-9.
- Groden, J., A. Thliveris, et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." Cell **66**(3): 589-600.
- Gurney, A., F. Axelrod, et al. (2012). "Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(29): 11717-11722.
- Habas, R., I. B. Dawid, et al. (2003). "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation." Genes Dev **17**(2): 295-309.
- Habas, R., Y. Kato, et al. (2001). "Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1." Cell **107**(7): 843-854.

- Hart, M. J., R. de los Santos, et al. (1998). "Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta." Curr Biol **8**(10): 573-581.
- He, X., M. Semenov, et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." Development **131**(8): 1663-1677.
- He, Y., W. Y. Zhang, et al. (2011). "Low serum concentration facilitates the differentiation of hepatic progenitor cells." Saudi Med J **32**(2): 128-134.
- Heisenberg, C. P., M. Tada, et al. (2000). "Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation." Nature **405**(6782): 76-81.
- Herr, M. J., J. Kotha, et al. (2013). "Tetraspanin CD9 promotes the invasive phenotype of human fibrosarcoma cells via upregulation of matrix metalloproteinase-9." PLoS One **8**(6): e67766.
- Hill, T. P., D. Spater, et al. (2005). "Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes." Dev Cell **8**(5): 727-738.
- Hinoi, T., H. Yamamoto, et al. (2000). "Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin." J Biol Chem **275**(44): 34399-34406.
- Hoang, B. H., T. Kubo, et al. (2004). "Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway." Cancer Res **64**(8): 2734-2739.
- Hoelters, J., M. Ciccarella, et al. (2005). "Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells." J Gene Med **7**(6): 718-728.
- Holmen, S. L., A. Salic, et al. (2002). "A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate beta -catenin-dependent signaling." J Biol Chem **277**(38): 34727-34735.
- Hsieh, J. C., L. Kodjabachian, et al. (1999). "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities." Nature **398**(6726): 431-436.
- Hurlstone, A. and H. Clevers (2002). "T-cell factors: turn-ons and turn-offs." EMBO J **21**(10): 2303-2311.
- Hwa, V., Y. Oh, et al. (1999). "The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily." Endocr Rev **20**(6): 761-787.
- Ikeda, S., S. Kishida, et al. (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin." EMBO J **17**(5): 1371-1384.

- Ilvesmaki, V., W. F. Blum, et al. (1993). "Insulin-like growth factor binding proteins in the human adrenal gland." Mol Cell Endocrinol **97**(1-2): 71-79.
- Ishitani, T., S. Kishida, et al. (2003). "The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling." Mol Cell Biol **23**(1): 131-139.
- Itoh, K., J. Jacob, et al. (1998). "A role for Xenopus Frizzled 8 in dorsal development." Mech Dev **74**(1-2): 145-157.
- Iwamoto, Y., K. Tanaka, et al. (1994). "In vitro assay of the invasive potential of malignant bone and soft tissue tumours through basement membranes." Int Orthop **18**(4): 240-247.
- Jianwei, Z., L. Fan, et al. (2013). "MicroRNA 181a improves proliferation and invasion, suppresses apoptosis of osteosarcoma cell." Tumour Biol **34**(6): 3331-3337.
- Joiner, D. M., J. Ke, et al. (2013). "LRP5 and LRP6 in development and disease." Trends Endocrinol Metab **24**(1): 31-39.
- Kalbacova, M., A. Broz, et al. (2012). "Influence of the fetal bovine serum proteins on the growth of human osteoblast cells on graphene." J Biomed Mater Res A **100**(11): 3001-3007.
- Karow, M., T. Popp, et al. (2009). "Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion and MMP expression." J Cell Mol Med **13**(8B): 2506-2520.
- Karow, M. (2008) Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Analyse einzelner Signalkomponenten und derer funktionellen Bedeutung bei Proliferation und Invasion. Dissertationsschrift an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kato, M., M. S. Patel, et al. (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor." J Cell Biol **157**(2): 303-314.
- Kawano, Y. and R. Kypta (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." J Cell Sci **116**(Pt 13): 2627-2634.
- Kay, B. K. and J. W. Kehoe (2004). "PDZ domains and their ligands." Chem Biol **11**(4): 423-425.
- Kelley, K. M., Y. Oh, et al. (1996). "Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics." Int J Biochem Cell Biol **28**(6): 619-637.
- Kemp, C. R., E. Willems, et al. (2007). "Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling." Dev Dyn **236**(7): 2011-2019.
- Kikuchi, A. (1999). "Roles of Axin in the Wnt signalling pathway." Cell Signal **11**(11): 777-788.

- Kikuchi, A. and H. Yamamoto (2008). "Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signaling." Cancer Sci **99**(2): 202-208.
- Kikuchi, A., H. Yamamoto, et al. (2007). "Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors." Cell Signal **19**(4): 659-671.
- Kim, M., H. C. Lee, et al. (2008). "Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells." J Hepatol **48**(5): 780-791.
- Kinard, F., L. De Clercq, et al. (1990). "Culture of endocrine pancreatic cells in protein-free, chemically defined media." In Vitro Cell Dev Biol **26**(10): 1004-1010.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.
- Kirikoshi, H., H. Sekihara, et al. (2001). "Expression profiles of 10 members of Frizzled gene family in human gastric cancer." Int J Oncol **19**(4): 767-771.
- Kishida, S., H. Yamamoto, et al. (2004). "Wnt-3a and Dvl induce neurite retraction by activating Rho-associated kinase." Mol Cell Biol **24**(10): 4487-4501.
- Kitagawa, M., S. Hatakeyama, et al. (1999). "An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin." EMBO J **18**(9): 2401-2410.
- Koesters, R., R. Ridder, et al. (1999). "Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors." Cancer Res **59**(16): 3880-3882.
- Kohn, A. D. and R. T. Moon (2005). "Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways." Cell Calcium **38**(3-4): 439-446.
- Kolben, T., I. Perobner, et al. (2012). "Dissecting the impact of Frizzled receptors in Wnt/beta-catenin signaling of human mesenchymal stem cells." Biol Chem **393**(12): 1433-1447.
- Kolben, T. (2010). "Wnt/ β -Catenin-Signalling an der Oberfläche von humanen mesenchymalen Stammzellen: Expression und Regulation der Frizzled-Rezeptoren." Dissertationsschrift an der Fakultät für Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1998). "Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse." Mol Cell Biol **18**(3): 1248-1256.
- Krenn, V., W. Rütther (Hrsg.) (2012). "Pathologie des Bewegungsapparates": 307-318 und 335
- Kuhl, M., L. C. Sheldahl, et al. (2000). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*." J Biol Chem **275**(17): 12701-12711.

- Kuhl, M., L. C. Sheldahl, et al. (2000). "The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." Trends Genet **16**(7): 279-283.
- Leach, R. J., S. S. Banga, et al. Report of the Third International Workshop on Human Chromosome 8 Mapping. San Antonio, Texas, October 25-27, 1996, Cytogenet Cell Genet. 1996;75(2-3):71-84.
- Leng, S. L., K. S. Leeding, et al. (2001). "Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II-induced but not basal proliferation and adhesion of LIM 1215 colon cancer cells." Mol Cell Endocrinol **174**(1-2): 121-127.
- Leow, C. C., M. S. Romero, et al. (2004). "Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells." Cancer Res **64**(17): 6050-6057.
- Leppert, M., M. Dobbs, et al. (1987). "The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5." Science **238**(4832): 1411-1413.
- Levanon, D., R. E. Goldstein, et al. (1998). "Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11590-11595.
- Levasseur, R., D. Lacombe, et al. (2005). "LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders." Joint Bone Spine **72**(3): 207-214.
- Leyns, L., T. Bouwmeester, et al. (1997). "Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer." Cell **88**(6): 747-756.
- Li, Y., W. Lu, et al. (2004). "LRP6 expression promotes cancer cell proliferation and tumorigenesis by altering beta-catenin subcellular distribution." Oncogene **23**(56): 9129-9135.
- Liu, C., Y. Li, et al. (2002). "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." Cell **108**(6): 837-847.
- Liu, G., A. Bafico, et al. (2003). "A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor." Mol Cell Biol **23**(16): 5825-5835.
- Liu, T., A. J. DeCostanzo, et al. (2001). "G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway." Science **292**(5522): 1718-1722.
- Liu, W., X. Dong, et al. (2000). "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." Nat Genet **26**(2): 146-147.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Love, J. J., X. Li, et al. (1995). "Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1." Nature **376**(6543): 791-795.

- Lu, P. and F. J. Sharom (1995). "Gangliosides are potent immunosuppressors of IL-2-mediated T-cell proliferation in a low protein environment." Immunology **86**(3): 356-363.
- Madan, B. and D. M. Virshup (2015). "Targeting Wnts at the source--new mechanisms, new biomarkers, new drugs." Mol Cancer Ther **14**(5): 1087-1094.
- Magoori, K., M. J. Kang, et al. (2003). "Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E." J Biol Chem **278**(13): 11331-11336.
- Mao, J., J. Wang, et al. (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." Mol Cell **7**(4): 801-809.
- Marsit, C. J., M. R. Karagas, et al. (2005). "Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer." Cancer Res **65**(16): 7081-7085.
- Mazerbourg, S., I. Callebaut, et al. (2004). "Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, in vitro and in vivo." Growth Horm IGF Res **14**(2): 71-84.
- McMahon, A. P. and A. Bradley (1990). "The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain." Cell **62**(6): 1073-1085.
- McMahon, A. P. and R. T. Moon (1989). "Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis." Cell **58**(6): 1075-1084.
- Melchior, K., J. Weiss, et al. (2008). "The WNT receptor FZD7 contributes to self-renewal signaling of human embryonic stem cells." Biol Chem **389**(7): 897-903.
- Miller, J. R. (2002). "The Wnts." Genome Biol **3**(1): REVIEWS3001.
- Minato, A., H. Ise, et al. (2012). "Cardiac differentiation of embryonic stem cells by substrate immobilization of insulin-like growth factor binding protein 4 with elastin-like polypeptides." Biomaterials **33**(2): 515-523.
- Mohan, S., Y. Nakao, et al. (1995). "Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells." J Biol Chem **270**(35): 20424-20431.
- Moon, R. T., J. D. Brown, et al. (1997). "Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands." Cell **88**(6): 725-728.
- Morata, G. and P. A. Lawrence (1977). "The development of wingless, a homeotic mutation of *Drosophila*." Dev Biol **56**(2): 227-240.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science **275**(5307): 1787-1790.
- Morris, A. J. and C. C. Malbon (1999). "Physiological regulation of G protein-linked signaling." Physiol Rev **79**(4): 1373-1430.

- Moschos, S. J. and C. S. Mantzoros (2002). "The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications." Oncology **63**(4): 317-332.
- Moxham, C. P. and C. C. Malbon (1985). "Fat cell beta 1-adrenergic receptor: structural evidence for existence of disulfide bridges essential for ligand binding." Biochemistry **24**(22): 6072-6077.
- Nagayama, S., C. Fukukawa, et al. (2005). "Therapeutic potential of antibodies against FZD 10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas." Oncogene **24**(41): 6201-6212.
- Neron, S., A. Roy, et al. (2011). "Effective in vitro expansion of CD40-activated human B lymphocytes in a defined bovine protein-free medium." J Immunol Methods **371**(1-2): 61-69.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." Cell **31**(1): 99-109.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1992). "Wnt genes." Cell **69**(7): 1073-1087.
- Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila." Nature **287**(5785): 795-801.
- Park, H. B., W. Son, et al. (2016). "Cell cloning-on-the-spot by using an attachable silicone cylinder." Biochem Biophys Res Commun **474**(4): 768-772.
- Patel, M. S. and G. Karsenty (2002). "Regulation of bone formation and vision by LRP5." N Engl J Med **346**(20): 1572-1574.
- Perobner, I., M. Karow, et al. (2012). "LRP6 mediates Wnt/beta-catenin signaling and regulates adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells." Int J Biochem Cell Biol **44**(11): 1970-1982.
- Piccolo, S., E. Agius, et al. (1999). "The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals." Nature **397**(6721): 707-710.
- Pinson, K. I., J. Brennan, et al. (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." Nature **407**(6803): 535-538.
- Planutis, K., M. Planutiene, et al. (2013). "Invasive colon cancer, but not non-invasive adenomas induce a gradient effect of Wnt pathway receptor frizzled 1 (Fz1) expression in the tumor microenvironment." J Transl Med **11**: 50.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-1851.
- Polakis, P. (2007). "The many ways of Wnt in cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(1): 45-51.
- Qie, S. and J. A. Diehl (2016). "Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment." J Mol Med (Berl) **94**(12): 1313-1326.
- Qin, X., D. D. Strong, et al. (1998). "Structure-function analysis of the human insulin-like growth factor binding protein-4." J Biol Chem **273**(36): 23509-23516.

- Rajaram, S., D. J. Baylink, et al. (1997). "Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions." Endocr Rev **18**(6): 801-831.
- Riese, J., X. Yu, et al. (1997). "LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic." Cell **88**(6): 777-787.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." Cell **50**(4): 649-657.
- Ring, L., P. Neth, et al. (2014). "beta-Catenin-dependent pathway activation by both promiscuous "canonical" WNT3a-, and specific "noncanonical" WNT4- and WNT5a-FZD receptor combinations with strong differences in LRP5 and LRP6 dependency." Cell Signal **26**(2): 260-267.
- Roose, J., M. Molenaar, et al. (1998). "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors." Nature **395**(6702): 608-612.
- Roth, W., C. Wild-Bode, et al. (2000). "Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells." Oncogene **19**(37): 4210-4220.
- Rothbacher, U., M. N. Laurent, et al. (2000). "Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis." EMBO J **19**(5): 1010-1022.
- Rubinfeld, B., P. Robbins, et al. (1997). "Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines." Science **275**(5307): 1790-1792.
- Salic, A., E. Lee, et al. (2000). "Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in Xenopus egg extracts." Mol Cell **5**(3): 523-532.
- Salsano, E., R. Pattera, et al. (2012). "Expression profile of frizzled receptors in human medulloblastomas." J Neurooncol **106**(2): 271-280.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Satoh, S., Y. Daigo, et al. (2000). "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." Nat Genet **24**(3): 245-250.
- Satow, R., T. C. Chan, et al. (2004). "The role of Xenopus frizzled-8 in pronephric development." Biochem Biophys Res Commun **321**(2): 487-494.
- Schaser, T., C. Wrede, et al. (2011). "RNAi-mediated gene silencing in tumour tissue using replication-competent retroviral vectors." Gene Ther **18**(10): 953-960.
- Schmitt, J. F., D. S. Millar, et al. (2002). "Hypermethylation of the inhibin alpha-subunit gene in prostate carcinoma." Mol Endocrinol **16**(2): 213-220.

- Schwarz-Romond, T., C. Asbrand, et al. (2002). "The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase I ϵ to the β -catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling." Genes Dev **16**(16): 2073-2084.
- Semenov, M. V., K. Tamai, et al. (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." Curr Biol **11**(12): 951-961.
- Shen, Q. and P. Singh (2004). "Identification of a novel SP3 binding site in the promoter of human IGFBP4 gene: role of SP3 and AP-1 in regulating promoter activity in CaCo2 cells." Oncogene **23**(14): 2454-2464.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, et al. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea." J Cell Comp Physiol **59**: 223-239.
- Slusarski, D. C., V. G. Corces, et al. (1997). "Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling." Nature **390**(6658): 410-413.
- Spencer, G. J., J. C. Utting, et al. (2006). "Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NF κ B ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro." J Cell Sci **119**(Pt 7): 1283-1296.
- Stambolic, V., L. Ruel, et al. (1996). "Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells." Curr Biol **6**(12): 1664-1668.
- Stine, Z. E., Z. E. Walton, et al. (2015). "MYC, Metabolism, and Cancer." Cancer Discov **5**(10): 1024-1039.
- Suzuki, A. and S. Ohno (2006). "The PAR-aPKC system: lessons in polarity." J Cell Sci **119**(Pt 6): 979-987.
- Suzuki, H., E. Gabrielson, et al. (2002). "A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer." Nat Genet **31**(2): 141-149.
- Suzuki, H., D. N. Watkins, et al. (2004). "Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer." Nat Genet **36**(4): 417-422.
- Tamai, K., M. Semenov, et al. (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." Nature **407**(6803): 530-535.
- Tamai, K., X. Zeng, et al. (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." Mol Cell **13**(1): 149-156.
- Teicher, B. A. (2012). "Searching for molecular targets in sarcoma." Biochem Pharmacol **84**(1): 1-10.
- Tetsu, O. and F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." Nature **398**(6726): 422-426.

- Tolwinski, N. S., M. Wehrli, et al. (2003). "Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity." Dev Cell **4**(3): 407-418.
- Travis, A., A. Amsterdam, et al. (1991). "LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]." Genes Dev **5**(5): 880-894.
- Ueno, K., S. Hazama, et al. (2009). "Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells." Br J Cancer **101**(8): 1374-1381.
- Ueno, K., H. Hirata, et al. (2011). "IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma." Int J Cancer **129**(10): 2360-2369.
- Umbhauer, M., A. Djiane, et al. (2000). "The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling." EMBO J **19**(18): 4944-4954.
- Uren, A., F. Reichsman, et al. (2000). "Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling." J Biol Chem **275**(6): 4374-4382.
- Uren, A., V. Wolf, et al. (2004). "Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma." Pediatr Blood Cancer **43**(3): 243-249.
- van de Wetering, M., M. Oosterwegel, et al. (1991). "Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box." EMBO J **10**(1): 123-132.
- van Es, J. H., N. Barker, et al. (2003). "You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway." Curr Opin Genet Dev **13**(1): 28-33.
- van Vliet, M., M. Kliffen, et al. (2009). "Soft tissue sarcomas at a glance: clinical, histological, and MR imaging features of malignant extremity soft tissue tumors." Eur Radiol **19**(6): 1499-1511.
- Veeman, M. T., J. D. Axelrod, et al. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." Dev Cell **5**(3): 367-377.
- Wang, H. Q., M. L. Xu, et al. (2012). "Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer." Biochem Biophys Res Commun **417**(1): 62-66.
- Wang, H. Y., T. Liu, et al. (2006). "Structure-function analysis of Frizzleds." Cell Signal **18**(7): 934-941.

- Wang, J., W. Niu, et al. (1998). "Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle alpha-actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia." Endocrinology **139**(5): 2605-2614.
- Wang, Y., J. P. Macke, et al. (1996). "A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled." J Biol Chem **271**(8): 4468-4476.
- Waterman, M. L., W. H. Fischer, et al. (1991). "A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer." Genes Dev **5**(4): 656-669.
- Wehrli, M., S. T. Dougan, et al. (2000). "arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." Nature **407**(6803): 527-530.
- Willert, J., M. Epping, et al. (2002). "A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells." BMC Dev Biol **2**: 8.
- Willert, K., J. D. Brown, et al. (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." Nature **423**(6938): 448-452.
- Winer, J., C. K. Jung, et al. (1999). "Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro." Anal Biochem **270**(1): 41-49.
- Wolf, M., S. Mousses, et al. (2004). "High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact of copy number on gene expression." Neoplasia **6**(3): 240-247.
- Wong, G. T., B. J. Gavin, et al. (1994). "Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes." Mol Cell Biol **14**(9): 6278-6286.
- Wong, H. C., A. Bourdelas, et al. (2003). "Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled." Mol Cell **12**(5): 1251-1260.
- Xue, Y., Y. Yan, et al. (2014). "Insulin-like growth factor binding protein 4 enhances cardiomyocytes induction in murine-induced pluripotent stem cells." J Cell Biochem **115**(9): 1495-1504.
- Yi, H. K., P. H. Hwang, et al. (2001). "Expression of the insulin-like growth factors (IGFs) and the IGF-binding proteins (IGFBPs) in human gastric cancer cells." Eur J Cancer **37**(17): 2257-2263.
- Yin, S., L. Xu, et al. (2013). "Tumor-initiating cells and FZD8 play a major role in drug resistance in triple-negative breast cancer." Mol Cancer Ther **12**(4): 491-498.
- Zeng, X., K. Tamai, et al. (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." Nature **438**(7069): 873-877.

- Zhang, X., J. Zhu, et al. (2007). "Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C." Nat Cell Biol **9**(7): 743-754.
- Zhou, J. and C. Bondy (1993). "Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis." Fertil Steril **60**(5): 897-904.
- Zhou, R., D. Diehl, et al. (2003). "IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences." J Endocrinol **178**(2): 177-193.
- Zhou, R., H. Flaswinkel, et al. (2004). "Insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits growth of the thymus in transgenic mice." J Mol Endocrinol **32**(2): 349-364.
- Zhu, W., I. Shiojima, et al. (2008). "IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis." Nature **454**(7202): 345-349.
- Zou, H., J. R. Molina, et al. (2005). "Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus." Int J Cancer **116**(4): 584-591.

I Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bedanken, an erster Stelle bei meinem Betreuer PD Dr. Peter Neth, welcher sowohl während, als auch nach Abschluss der experimentellen Arbeiten immer guten Mut behielt. Für seine fachliche, aber auch unvergleichliche menschliche Unterstützung bin ich ihm sehr, sehr dankbar.

Überaus dankbar bin ich auch meiner Doktormutter Frau Prof. Marianne Jochum für ihren großen Einsatz in der wissenschaftlichen Förderung ihrer Doktoranden und für ihre großzügige Unterstützung.

Sehr danken möchte ich auch Frau Claudia Geißler, welche mir mit viel Genauigkeit die Möglichkeiten der molekularbiologischen Methoden näherbrachte. Ein ebenso großer Dank gebührt Frau Lourdes Ruiz-Heinrich, welche mich mit ihrer fröhlichen Art in die Zell-Kultur einführte.

Auch möchte ich mich bei meinen naturwissenschaftlichen Mit-Doktoranden Dr. Iris Peröbner, Dr. Simon Capovilla, Dr. Marisa Karow, Dr. Tanja Popp und Dr. Virginia Egea-Alonso bedanken, welche mir stets mit viel Rat und Tat zur Seite standen und die Arbeit im Labor zu einer sehr schönen Erfahrung machten.

Ebenso danke ich meinen MolMed Mit-Doktoranden Thomas Kolben, Felix Lechner, Wenzel Schicho, Raphael Metzler und Simon Schuster für die vielen inspirierenden und konspirativen Momente. Auch außerhalb des Institutes habe ich in ihnen Freunde gefunden.

Ein besonderer und alles umfassender Dank gilt meinen Eltern Renate und Udo Leitenstern sowie meinen beiden Schwestern Regine und Lucia. Sie standen während der Promotion und in jeder anderen Lebenslage an meiner Seite. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

J Eidesstattliche Versicherung

Leitenstern, Ulrike

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Funktionale Charakterisierung von Frizzled-Rezeptoren
in mesodermalen Tumor-Zellen
Einfluss von Frizzled 8 auf Proliferation und Invasion**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 17.12.2018

Ort, Datum

Ulrike Leitenstern

Unterschrift Doktorandin/Doktorand